

**ВЕТЕРИНАРНЫЙ  
ВРАЧ**

**№ 2  
2023**

**THE VETERINARIAN**

ISSN 1998-698X  
DOI: 10.33632/1998-698X

**НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ  
RESEARCH & INDUSTRIAL JOURNAL**



**ЖУРНАЛ ДЛЯ ПРОФЕССИОНАЛОВ ОТ ПРОФЕССИОНАЛОВ**

# В Федеральном центре токсикологической, радиационной и биологической безопасности разработана и выпускается ассоциированная вакцина против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота

## Инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота

– острое контагиозное заболевание, характеризующееся слезотечением, гиперемией сосудов конъюнктивы, светобоязнью, серозно-гнойным истечением, помутнением и изъязвлением роговицы, деформацией глазного яблока в виде кератоглобула или кератоконуса, частичной или полной потерей зрения пораженного глаза животного.

## Экономический ущерб от заболевания складывается из:

- потерь молочной продуктивности;
- потерь от снижения привесов;
- снижения племенной ценности;
- затрат на лечебные мероприятия.

## С профилактической целью вакцину вводят двукратно, в дозах:

- телятам до 6 мес. – 3 см<sup>3</sup>;
- молодняку до 12 мес. – 5 см<sup>3</sup>;
- молодняку старше 1 года и коровам – 10 см<sup>3</sup>.

**Применение данной вакцины обеспечивает надежную защиту от заболеваемости (95-97%).**

**АНАЛОГОВ ВАКЦИНЫ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ НЕТ**



## СОДЕРЖАНИЕ

**ПАТОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ, МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ,  
ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ**

<b>Махмутов А.Ф., Спиридонов Г.Н., Дуплева Л.Ш., Насертдинов Д.Д., Хурамшина М.Т. ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА МАСТИТОВ КОРОВ В КРУПНЫХ ЖИВОТНОВОДЧЕСКИХ КОМПЛЕКСАХ ПО ПРОИЗВОДСТВУ МОЛОКА .....</b>	<b>4</b>
--	----------

**САНИТАРИЯ, ГИГИЕНА, ЭКОЛОГИЯ, ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНАЯ  
ЭКСПЕРТИЗА И БИОБЕЗОПАСНОСТЬ**

<b>Галяутдинова Г.Г., Сагдеева З.Х., Шлямина О.В. ОЦЕНКА ОБЩЕЙ ТОКСИЧНОСТИ КОРМОВ БИОТЕСТИРОВАНИЕМ НА ПРОСТЕЙШИХ И НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ .....</b>	<b>10</b>
<b>Куц И.В., Удавлиев Д.И., Баиров А.Л., Грудев А.И., Шубина Е.Г. ПЕСТИЦИДЫ В ПЧЕЛИНОМ МЁДЕ И ПРОДУКТАХ ПЧЕЛОВОДСТВА .....</b>	<b>17</b>

**ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ И ИММУНОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ**

<b>Мухаммадиев Рин. С., Мусин Р.Р., Титова В.Ю., Трemasова А.М., Скворцов Е.В. ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ВЕЩЕСТВ В ОТНОШЕНИИ ДЕРМАТОФИТОВ РОДА MICROSPORUM .....</b>	<b>23</b>
<b>Потехина Р.М., Фролов А.В., Майорова Е.Н., Милованкин Д.И., Миргазов Д.А. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КОМПОЗИЦИИ КАК ЛЕЧЕБНОГО СРЕДСТВА ПРИ ДИАРЕЕ МОЛОДНЯКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА .....</b>	<b>28</b>
<b>Семенов В.Г., Симурзина Е.П., Никитин Д.А., Караулов Р.С., Захаровский Г.В., Лузова А.В. ИММУННАЯ ЗАЩИТА ТЕЛЯТ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КАЧЕСТВА МОЛОЗИВА .....</b>	<b>33</b>
<b>Фахрутдинов Н.А., Анисимова Е.А., Миргазов Д.А., Мустафина Э.Н., Осянин К.А. ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ШТАММОВ BACILLUS ANTHRACIS МЕТОДОМ АНАЛИЗА ТЕМПЕРАТУР ПЛАВЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ ПЦР, ПОЛУЧЕННЫХ ПОСЛЕ АМПЛИФИКАЦИИ VNTR ЛОКУСОВ .....</b>	<b>41</b>
<b>Хайдаршина Н.Э., Даллакян К.В., Тимурбаева Р.Р. АНТИБИОТИКО-ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ АЭРОБНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ КИШЕЧНОЙ НОРМОБИОТЫ ДОМАШНИХ ПИТОМЦЕВ, ОБИТАЮЩИХ В Г. ЧЕЛЯБИНСК .....</b>	<b>47</b>

**РАДИОБИОЛОГИЯ**

<b>Галямова М.Ю., Вагин К.Н., Махмутов А.Ф., Кашеваров Г.С., Саитов В.Р. МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БАКТЕРИЙ ESCHERICHIA COLI ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ.....</b>	<b>55</b>
<b>Семёнов Э.И., Мишина Н.Н., Валиев А.Р., Матросова Л.Е., Вагин К.Н., Василевский Н.М. ВЛИЯНИЕ КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ МИКОТОКСИНОВ И ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА АЛЛЕРГИЧЕСКУЮ СЕНСИБИЛИЗАЦИЮ...</b>	<b>60</b>

**БИОТЕХНОЛОГИЯ**

<b>Марзанова С.Н., Коновалова Н.В., Алексеев Я.И., Ходарович Ю.М., Девришов Д.А., Марзанов Н.С. ОСОБЕННОСТИ ПОДБОРА ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДОВ ГЕНА КАППА-КАЗЕИНА (CSN3) ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ (ПЦР-РВ) .....</b>	<b>70</b>
---	-----------

Ветеринарный врач. 2023. № 2. С. 4 – 9.  
The Veterinarian. 2023; (2): 4 – 9

Научная статья  
УДК 619:618.19- 002:636.2:579.2  
DOI: 10.33632/1998-698X\_2023\_2\_4

### Этиологическая структура маститов коров в крупных животноводческих комплексах по производству молока

Айдар Фаритович Махмутов, Геннадий Николаевич Спиридонов, Лилия Шамилевна Дуплева,  
Динар Дамирович Насертдинов, Миляуша Талгатовна Хурамшина

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», отделение бактериологии, лаборатория бактериальных патологий животных, Казань, Россия

Автор, ответственный за переписку: Геннадий Николаевич Спиридонов, spiridonovkzn57@gmail.com

**Аннотация.** Молочное скотоводство является ведущей отраслью сельского хозяйства России. Среди многих болезней коров акушерско-гинекологические заболевания являются основными, которые тормозят рост производительности и воспроизведения. Экономические убытки, прежде всего, связаны со снижением молочной продуктивности или полным прекращением лактации, а также с преждевременной выбраковкой скота. При этом особое значение приобретает ранняя диагностика и профилактика заболеваний молочной железы. В настоящей работе представлены результаты изучения этиологии заболеваний молочной железы коров в крупных животноводческих комплексах по производству молока. Исследовано 117 проб молока от коров, больных маститами, 28 проб генитальных секретов от больных эндометритами коров, полученных из 18 промышленных комплексов. При бактериологическом исследовании выделено 126 изолята *Streptococcus*, 25 – *Staphylococcus*, 3 – *Micrococcus*, 41 – *Escherichia coli*, 9 – *Proteus vulgaris*, 5 – *Yersinia* и 3 – *Candida*. Таким образом, в результате проведенных исследований изучена этиологическая структура инфекционных маститов коров, выделены основные возбудители болезни.

**Ключевые слова:** мастит, возбудитель, диагностика, заболевание молочной железы, коровы, нетели

### The etiological structure of mastitis in cows in large livestock complexes for milk production

Aidar F. Makhmutov, Gennady N. Spiridonov, Lilia Sh. Dupleva, Dinar D. Nasertdinov, Milyausha T. Khuramshina

Federal State Budgetary Scientific Institution «Federal Center for toxicological, radiation, and biological safety», department of bacteriology, laboratory of bacterial animal pathologies, Kazan, Russia

Corresponding author: Gennady Nikolayevich Spiridonov, spiridonovkzn57@gmail.com

**Abstract.** Dairy cattle breeding is the leading branch of agriculture in Russia. Among the many diseases of cows, obstetric and gynecological diseases are the main ones that inhibit the growth of productivity and reproduction. Economic losses are primarily associated with a decrease in milk productivity or a complete cessation of lactation, as well as with premature culling of livestock. At the same time, early diagnosis and prevention of mammary gland diseases are of particular importance. This paper presents the results of study the etiology of the mammary gland diseases in cows in large livestock complexes for the milk production. 117 samples of milk from cows with mastitis and 28 samples of genital secretions from cows with endometritis were obtained from 18 industrial complexes and studied. 126 isolates of *Streptococcus*, 25 of *Staphylococcus*, 3 of *Micrococcus*, 41 of *Escherichia coli*, 9 of *Proteus vulgaris*, 5 of *Yersinia* and 3 of *Candida* have been isolated by bacteriological examination. Thus, as a result of the research, the etiological structure of infectious mastitis in cows was studied, the main pathogens of the disease were identified.

**Keywords:** mastitis, pathogen, diagnosis, mammary gland disease, cows, heifers

**Введение.** Болезни молочной железы – маститы занимают наибольший удельный вес среди акушерско-гинекологических заболеваний коров. Они наносят большой экономический урон

производителям молока за счет снижения количества и качества молока, преждевременной выбраковки коров, заболеваемости новорожденных телят из-за потребления некачественного молозива и затрат на лечение. В среднем от 15 % до 30 % коров в стаде ежегодно переболевает различными формами мастита, а в ряде хозяйств этот показатель достигает до 70 %. У коров, переболевших маститами отмечается снижение продуктивности до 20 % от их потенциала.

Соматические клетки, патогенная и условно-патогенная микрофлора, присутствующие в маститном молоке, а также ингибирующие вещества в виде остаточных количеств антибактериальных препаратов, используемых для терапии, ведут к нарушению технологии производства молочнокислой продукции, сыров, низкое качество которых отрицательно сказывается на здоровье человека [1, 2, 5, 7, 8].

Воспаление молочной железы носит в основном инфекционный характер и связано оно с проникновением патогенной микрофлоры через сосковый канал в вымя и усиленным размножением ее в паренхиме. Попаданию микроорганизмов через сосковый канал в вымя способствует расслабление сфинктера соска. Обработка вымени после доения способствует закрытию соскового канала и предотвращению проникания патогенной микрофлоры в молочную цистерну.

Патогенные микроорганизмы часто поступают через раны молочной железы, сосковый канал и другие внутренние органы при развитии в них воспалительных процессов (эндометрит, гастроэнтерит) [4].

Возбудителями маститов являются различные виды микроорганизмов: стрептококки, стафилококки, кишечная палочка, грибы, клебсиеллы, микоплазмы и другие.

В условиях промышленных комплексов по производству молока особое значение имеет ранняя диагностика и профилактика заболеваний молочной железы, своевременное и эффективное лечение больных животных, восстановление функции пораженных долей вымени для сохранения высокой продуктивности коров [3].

Целью исследования явилось изучение этиологической структуры маститов коров в крупных животноводческих комплексах по производству молока.

**Материалы и методы.** Работа проводилась в условиях лаборатории бактериальных патологий животных ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» и промышленных комплексов по производству молока, расположенных в Приволжском федеральном округе.

Объектами для лабораторных исследований служили патологический материал от больных маститами коров (молозиво, молоко, измененные выделения из молочной железы) и пробы генитальных секретов от коров с признаками эндометритов в послеродовой период.

Диагностика маститов осуществлялась при помощи диагностикума «Кенотест». Дополнительно проводилось определение количества соматических клеток в молоке по условной вязкости, измеряемой по времени вытекания контролируемой пробы через капилляр на вискозиметрическом анализаторе молока «Соматос-Мини».

Типизация выделенных возбудителей болезни проводилась путем изучения их культуральных, морфологических, серологических свойств, патогенности для лабораторных животных согласно «Определителю зоопатогенных микроорганизмов» [6]. При изучении культуральных свойства учитывали характер их роста на питательных средах, внешний вид колоний, их размер, цвет, прозрачность, характер поверхности, наличие или отсутствие зоны гемолиза, тинкториальные свойства. Устанавливали видовую принадлежность бактерий, руководствуясь «Определителем бактерий» Берги [9].

**Результаты исследований.** Проведено лабораторное исследование 117 проб молока от коров, больных маститами, 28 проб генитальных секретов от коров больных эндометритами, полученных из 18 промышленных комплексов по производству молока, расположенных в Республике Татарстан, Ульяновской, Самарской областях и Чувашской Республике.

В 16 пробах молока из ООО «Тукаевский» обнаружены соматические клетки свыше 1,5 млн клеток, что указывает на то, что в молочных железах у коров наблюдается острый воспалительный процесс, характерный для мастита. При бактериологическом исследовании 20 проб молока от больных маститами коров в 17 пробах выделены *Streptococcus*, в 2 пробах – *Streptococcus* и *Escherichia coli*, в 1 пробе – *Escherichia coli*.

Таблица 1 – Обобщенные данные бактериологического исследования проб молока и генитальных секретов от коров

Наименование хозяйства, региона	Вид биопробы	Количество проб	Выделенный микроорганизм	Количество изолятов
КФХ «Цветкова У.Н.» Республика Татарстан	молоко	10	<i>Streptococcus</i>	9
			<i>Staphylococcus aureus</i>	1
			<i>Escherichia coli</i>	4
«СПК имени Н.К. Крупской» Ульяновская область	молоко	4	<i>Streptococcus</i>	4
			<i>Micrococcus</i>	1
ООО «Фортерра» Республика Татарстан	молоко	3	<i>Streptococcus</i>	3
ОАО «Красный Восток Агро» Республика Татарстан	молоко	3	<i>Streptococcus</i>	3
			<i>Escherichia coli</i>	3
			<i>Proteus vulgaris</i>	3
ООО «Среднее Девятово» Республика Татарстан	молоко	15	<i>Streptococcus</i>	15
			<i>Staphylococcus aureus</i>	11
			<i>Escherichia coli</i>	1
			дрожжи	1
ООО «Проммол» Самарская область	молоко	6	<i>Streptococcus</i>	6
Из частного сектора с. Тавлино Республика Татарстан	молоко	3	<i>Streptococcus</i> ( <i>Diplococcus</i> )	3
			дрожжи (рода <i>Candida</i> )	2
ПСХК «Ембулатово» Республика Татарстан	молоко	2	Патогенные микроорганизмы не выделены	
КФХ «Ильнур» Республика Татарстан	молоко	2	<i>Streptococcus</i>	2
			<i>Staphylococcus</i>	2
			<i>Micrococcus</i>	2
АО «Фирма Акконд-Агро» Чувашская Республика	молоко	1	<i>Staphylococcus</i>	1
	генитальные секреты	4	<i>Streptococcus</i>	4
			<i>Staphylococcus</i>	1
			<i>Escherichia coli</i>	3
<i>Yersinia</i>	1			
ООО «Аксу Агро» Республика Татарстан	генитальные секреты	5	<i>Streptococcus</i>	5
ООО «Агрофирма «Южная» Республика Татарстан	генитальные секреты	5	<i>Streptococcus</i>	5
КФХ «Сулейманова А.И.» Республика Татарстан	генитальные секреты	5	<i>Streptococcus</i>	5
ООО «Тукаевский» Республика Татарстан	молоко	20	<i>Streptococcus</i>	19
			<i>Escherichia coli</i>	3
ООО «СП «Смаиль» Республика Татарстан	молоко	26	<i>Streptococcus</i>	23
			<i>Escherichia coli</i>	15
			<i>Staphylococcus</i>	5
			<i>Proteus vulgaris</i>	1
ООО «Имени Нур Баяна» Республика Татарстан	молоко	13	<i>Streptococcus</i>	11
			<i>Escherichia coli</i>	10
			<i>Proteus vulgaris</i>	2
	генитальные секреты	5	<i>Streptococcus</i>	5
			<i>Proteus vulgaris</i>	3
ООО «ПМК» Республика Татарстан	молоко	6	<i>Streptococcus</i>	4
			<i>Staphylococcus</i>	2
ООО «Агрофирма «Кырлай» Республика Татарстан	молоко	3	<i>Streptococcus</i>	2
			<i>Staphylococcus</i>	1

	генитальные секреты	4	<i>Streptococcus</i>	4
			<i>Staphylococcus</i>	1
			<i>Escherichia coli</i>	1
			<i>Yersinia Pseudotuberculosis</i>	4

Проведено лабораторное исследование 26 проб молока от коров, больных маститами, из ООО «СП «Смаиль». При этом в 14 пробах молока от коров под инвентарными номерами 767, 440, 675, 227, 4213, 208, 4045, 407, 594, 401, 201, 909, 4171 и 338 выделены культуры бактерий *Streptococcus* и *Escherichia coli*; в пробе молока от коровы под инвентарным номером 4191 выделен *Escherichia coli* и в пробе молока от коровы под номером 4102 выделены *Streptococcus (Diplococcus)* и *Proteus vulgaris*; в пробах молока от коров под номерами 858, 601 и 871 выделен *Streptococcus*. В пробах молока от коров под номерами 4034, 233, 388, 502 и 357 выделены *Streptococcus* и *Staphylococcus*, а в пробах молока от коров под номерами 754 и 225 бактериальная микрофлора не выделена. Таким образом, установлено, что заболевание молочных желез у коров в ООО «СП «Смаиль» вызвано патогенными микроорганизмами *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Proteus vulgaris*.

При проведении лабораторного исследования 13 проб молока от больных маститами коров и 5 проб генитальных секретов от коров, больных эндометритами, из ООО «Имени Нур Баяна». В пробах молока от коровы под инвентарным номером 27 выделены культуры бактерий *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*; в 7 пробах молока от коров под номерами 216, 3440, 36, 7480, 80970, 9 и 697 выделены – *Streptococcus* и *Escherichia coli*. В 2 пробах молока от коров под номерами 7492 и 475 изолирован *Streptococcus*; от 2 коров под номерами 522 и 138 – *Escherichia coli*, а от коровы под номером 59390 – *Streptococcus* и *Proteus vulgaris*. В пробах генитальных секретов от больных эндометритами коров выделены культуры бактерий *Streptococcus*, *Proteus vulgaris*.

Проведено бактериологическое исследование 6 проб молока от коров, больных маститами, из ООО «ПМК» Республики Татарстан. При этом в 2 пробах выделены патогенные для лабораторных животных (белые мыши, кролики) микроорганизмы – *Staphylococcus*, *Streptococcus* и в 2 пробах – *Streptococcus*.

Причиной заболевания коров маститами в ООО «Агрофирма «Кырлай» явились стрептококки и стафилококки, а эндометриты были вызваны стрептококками, стафилококками, кишечной палочкой и иерсиниями.

Результаты бактериологического исследования 10 проб молока от коров, больных маститами, из КФХ «Цветкова У.Н.» показало, что причиной заболевания коров маститами в данном хозяйстве являются стрептококки, стафилококки и кишечная палочка.

Проведено лабораторное исследование 4 проб молозива от коров, больных маститами, из «СПК им. Н.К. Крупской». При этом в пробах молозива от коров выделены культуры бактерий *Streptococcus* и *Micrococcus*. Следовательно, заболевание молочных желез у коров в «СПК им. Н.К. Крупской» вызвано патогенными микроорганизмами *Streptococcus* и *Micrococcus*.

При бактериологическом исследовании 3 проб молока от коров, больных маститами, из ООО «Фортерра» выделены патогенные для лабораторных животных (белые мыши) *Streptococcus*.

Результаты бактериологического исследования 3 проб молока от больных маститами коров, принадлежащих ОАО «Красный Восток Агро», показали, что во всех исследуемых пробах выделены патогенные для лабораторных животных (белые мыши) *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*.

При бактериологическом исследовании 15 проб молока от больных маститами коров, принадлежащих ООО «Среднее Девятово», установили наличие в них патогенных для лабораторных животных (белые мыши) микроорганизмов рода *Escherichia coli*, *Streptococcus* и дрожжи (рода *Candida*), а в пробах молока под номерами 1, 3, 5, 8, 9 и 10 – *Staphylococcus*.

Проведено бактериологическое исследование 6 проб молока от коров, больных маститами, из ООО «Проммол». При этом во всех пробах выделены патогенные для лабораторных животных (белые мыши) *Streptococcus*.

При бактериологическом исследовании 3 проб молока от коров, больных маститами, из частного сектора с. Тавлино выделены в одной пробе *Streptococcus (Diplococcus)*, а в двух других – *Streptococcus (Diplococcus)* и дрожжи рода *Candida*.

При бактериологическом исследовании 2 проб молока от коров, больных маститами, из ПСХК «Ембулатово», патогенные микроорганизмы не выделены.

Проведено бактериологическое исследование 2 проб молока от коров, больных маститами, из КФХ «Ильнур». При этом в пробах молока выделены культуры бактерий *Streptococcus*, *Staphylococcus* и *Micrococcus*.

При бактериологическом исследовании пробы молока от коровы из АО «Фирма Акконд-Агро» выделены культуры бактерий *Staphylococcus*, а из проб генитальных секретов от больных эндометритами коров выделены патогенные бактерии *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia coli* и *Yersinia*.

Проведено лабораторное исследование 15 проб генитальных секретов от коров больных эндометритами из ООО «Аксу Агро», ООО «Агрофирма «Южная» и КФХ «Сулейманова А.И.». В пробах генитальных секретов от всех 15 больных эндометритами коров выделены культуры бактерий *Streptococcus*.

**Заключение.** Проведено лабораторное исследование 117 проб молока от коров, больных маститами, 28 проб генитальных секретов от больных эндометритами коров, полученных из 18 промышленных комплексов по производству молока, расположенных в Республике Татарстан, Ульяновской, Самарской областях и Чувашской Республике.

При лабораторном исследовании проб молока и генитальных секретов от коров, больных маститами и эндометритами, выделено 126 изолятов *Streptococcus*, 25 – *Staphylococcus*, 3 – *Micrococcus*, 41 – *Escherichia coli*, 9 – *Proteus vulgaris*, 5 – *Yersinia* и 3 – *Candida*.

Таким образом, установлено, что в обследованных хозяйствах маститы и эндометриты коров носят инфекционный характер и вызваны они патогенными культурами стрептококков, стафилококков, эшерихий коли, протей, иерсиний, а также грибами кандиды.

### Литература

1. Горчаков, В. В. К причинам низких показателей воспроизводства крупного рогатого скота и сохранности молодняка / В. В. Горчаков, З. Я. Косорлукова, Р. Е. Ким // Ветеринарная патология. – 2003. – № 2. – С. 51–52.
2. Коба, И. С. Этиология и патогенез послеродового эндометрита у коров / И. С. Коба, М. Б. Решетка, М. С. Дубовикова // Вестник АПК Ставрополя. – 2015. – № 4 (20). – С. 95–98.
3. Копчекчи, М. Е. Терапия коров с послеродовыми эндометритами – актуальная проблема акушерско-гинекологической патологии / М. Е. Копчекчи, А. В. Егунова // Ветеринарная медицина. Современные проблемы и перспективы развития : материалы Международной научно-практической конференции. – Саратов, 2010. – С. 232–233.
4. Микрофлора молока и половых путей коров, больных маститом и эндометритом / Л. И. Ефанова, Н. Т. Климов, Ю. А. Рубцова [и др.] // Современные проблемы ветеринарного обеспечения репродуктивного здоровья животных : материалы Международной научно-практической конференции. – Воронеж, 2009. – С. 168–172.
5. Осколкова, М. В. Этиология мастита и его взаимосвязь с гинекологическими заболеваниями крупного рогатого скота / М. В. Осколкова, Э. В. Кузьмина // Ветеринария. – 2014. – № 4 (48). – С. 86–88.
6. Сидоров, М. А. Определитель зоопатогенных микроорганизмов : справочник / М. А. Сидоров, Д. И. Скородумов, В. Б. Федотов. – Москва : Колос, 1995. – С. 169–176.
7. Слободяник, В. И. Мастит и акушерская патология у коров / В. И. Слободяник, А. Г. Нежданов, В. Г. Зинькевич // Ветеринария. – 1999. – № 9. – С. 36–39.
8. Турченко, А. Н. Акушерско-гинекологическая патология у коров на фермах промышленного типа в Краснодарском крае / А. Н. Турченко, И. С. Коба // Актуальные проблемы современной ветеринарии : материалы Международной научно-практической конференции. – Краснодар, 2012. – С. 92–94.
9. Хаулта, Дж. Краткий определитель бактерий Берги. – Москва : Мир, 1980. – 496 с.

### References

1. Gorchakov, V. V. The reasons for the low reproductive activity of cattle and the keeping of calves / V. V. Gorchakov, Z. Ya. Kosorlukova, R. E., Kim // Veterinary Pathology. – 2003. – No 2. – P. 51–52.
2. Koba, I. S. Etiology and pathogenesis of postpartum endometritis in cows / I. S. Koba, M. B. Reshetka, M. S. Dubovikova // Agricultural Bulletin of Stavropol Region. – 2015. – No 4 (20). – P. 95–98.
3. Kopychekchi, M. E. Therapy of cows with postpartum endometritis – an urgent problem of obstetric and gynecological pathology / M. E. Kopychekchi, A. V. Egunova // Veterinary medicine. Modern problems



- and development prospects : materials of the International Scientific and Practical Conference. – Saratov, 2010. – P. 232–233.
4. Microflora of milk and genital tract of cows with mastitis and endometritis / L. I. Efanova, N. T. Klimov, Yu. A. Rubtsova [et al.] // Modern problems of veterinary provision of animals reproductive health: materials of the International Scientific and Practical Conference. – Voronezh, 2009. – P. 168–172.
  5. Oskolkova, M. V. Etiology of mastitis and its interrelation with gynecologic diseases / M. V. Oskolkova, E. V. Kuzmina // Veterinary. – 2014. – No 4 (48). – P. 86–88.
  6. Sidorov, M. A. Zoopathogenic microorganisms determinant : reference book / M. A. Sidorov, D. I. Skorodumov, V. B. Fedotov. – Moscow : Kolos, 1995. – P. 169–176.
  7. Slobodyanik, V. I. Mastitis and obstetrical pathology in cows / V. I. Slobodyanik, A.G. Nezhdanov, V. G. Zinkevich // Veterinary. – 1999. – No 9. – P. 36–39.
  8. Turchenko, A. N. Obstetric and gynecological pathology in cows on industrial-type farms in the Krasnodar Territory / A. N. Turchenko, I. S. Koba // Actual problems of modern veterinary science : materials of the International Scientific and Practical Conference. – Krasnodar, 2012. – P. 92–94.
  9. Holt, J. Bergey's manual of systematic bacteriology. – Moscow : Mir, 1980. – 496 p.

Ветеринарный врач. 2023. № 2. С. 10 – 16.  
The Veterinarian. 2023; (2): 10 – 16

Научная статья  
УДК 619: 615.9:636.085  
DOI: 10.33632/1998-698X\_2023\_2\_10

### **Оценка общей токсичности кормов биотестированием на простейших и на лабораторных животных**

Гульнара Габитовна Галяутдинова, Зухра Халимовна Сагдеева, Оксана Викторовна Шлямина

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», Испытательный центр, Казань, Россия

Автор ответственный за переписку: Гульнара Габитовна Галяутдинова, galyautdinovaggg@gmail.com

**Аннотация.** Обеспечение высокой продуктивности сельскохозяйственных животных и птицы возможно только при организации сбалансированного кормления. Кормовая база должна удовлетворять потребность живого организма в необходимых питательных веществах, в нужном количестве и в правильном соотношении. В связи с этим промышленность выпускает комбикорм уже обогащенный витаминами, ферментами, аминокислотами, микро- и макроэлементами, антибиотиками, пробиотиками и др. При производстве комбикормов учитываются особенности и потребности в питательных веществах разных видов животных. В зависимости от назначения они подразделяются для крупного и мелкого скота, для свиней, для птицы, для кроликов и др. Однако в результате увеличения роста различных добавок при производстве комбикормов все чаще встает вопрос о возможности применения методики общей токсичности кормов и достоверности получаемых результатов. Влияют ли включения кормовых добавок на выживаемость простейших, а также на возможность возникновения «ложной токсичности» при накожном нанесении и воздействие на пищеварительную систему теплокровных животных? Целью настоящей работы являлась оценка общей токсичности комбикормов, поступивших в Испытательный центр (ИЦ) «ФЦТРБ-ВНИВИ», по выживаемости на тест-культурах и на виварных лабораторных животных (мыши, кролики) согласно ГОСТ 31674-2012 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения токсичности». При первичном скрининге на *Styloynchia mytilus* установлена токсичность кормов, содержащих в своем составе добавки в виде ферментов, консервантов, антибиотиков и др. Однако подтверждающий метод биотестирования на виварных лабораторных животных (кролики, мыши) не выявил токсичность в большинстве исследуемых кормов.

**Ключевые слова:** общая токсичность, корма, комбикорм, биотестирование, простейшие, кролики, мыши

### **Evaluation of total toxicity of feed by biotesting on simply and laboratory animals**

Gulnara G. Galyautdinova, Zuhra Kh. Sagdeeva, Oksana V. Shlyamina

Federal State Budgetary Scientific Institution «Federal Center for toxicological, radiation, and biological safety», Testing center, Kazan, Russia.

Corresponding author: Gulnara Gabitovna Galyautdinova, galyautdinovaggg@gmail.com

**Abstract.** Ensuring high productivity of farm animals and poultry is possible only with the organization of balanced feeding. The fodder base must satisfy the needs of a living organism for the necessary nutrients, in the right amount and in the right ratio. In this regard, the industry produces compound feeds already enriched with vitamins, enzymes, amino acids, micro- and macroelements, antibiotics, probiotics, etc. In the production of compound feeds, the peculiarities and requirements for nutrients of different types of animals are taken into account. Depending on the purpose, they are subdivided for cattle and small livestock, for pigs, for poultry, for rabbits, etc. However, as a result of an increase in the growth of various additives in the production of compound feed, the question of the possibility of using the method of general toxicity of feed and the reliability of the results is increasingly being raised. Do the inclusions of feed additives affect the

survival of protozoa, as well as the possibility of «false toxicity» during cutaneous application and the effect on the digestive system of warm-blooded animals? The purpose of this work was to assess the overall toxicity of feed received at the ICTRB-VNIVI by survival rate on test cultures and on vivary laboratory animals (mice, rabbits) in accordance with GOST 31674-2012 «Feed, compound feed, compound feed raw materials. Methods for determining toxicity». During the primary screening for *Stylostrongylus mytilus*, the toxicity of feeds containing additives in the form of enzymes, preservatives, antibiotics, etc. was established. However, the confirmatory biotesting method on vivary laboratory animals (rabbits, mice) did not reveal toxicity in most of the studied feeds.

**Keywords:** general toxicity, feed, compound feed, biotesting, protozoa, rabbits, mice

**Введение.** Контроль качества кормов, комбикормов и комбикормового сырья – важное условие повышения продуктивности сельскохозяйственных животных и птиц. Экспериментально доказано, что высокая продуктивность сельскохозяйственных животных и птицы, заложенная генетически, проявляется только при организации физиологически обоснованного и сбалансированного кормления [10, 11]. В интенсивном животноводстве этому направлению зоологической науки уделяется максимум внимания. Важно, чтобы кормовая база удовлетворяла потребность животных в необходимых питательных веществах и других элементах. Поэтому они должны поступать в организм в нужном количестве и в правильном соотношении [12, 13, 14]. Обеспечить такой баланс могут готовые комбикорма, которые создаются с учетом достижений современной биохимии и физиологии животных.

Комбикорм состоит из очищенной и измельченной кормовой смеси растительного и животного происхождения. Для его обогащения добавляют витамины, микро- и макроэлементы, ферменты, антибиотики и другие компоненты, необходимые для нормального роста и развития сельскохозяйственных животных [4]. Основными компонентами при производстве комбикормов являются:

- зерновые культуры углеводсодержащие продукты (пшеница, ячмень, овес, просо, тритикале, кукуруза),

- жмыхи шрота (льна, сои, подсолнечника),

- бобовые с повышенным содержанием белка (soя, бобы, горох, нут, люпин),

- масличные культуры (рапс, подсолнечник, хлопчатник, рыжик, сурепка),

- сено, солома, другие грубые корма с высоким содержанием клетчатки,

- отходы зерновой и пищевой промышленности,

- аминокислоты,

- минеральные смеси,

- витаминные добавки,

- антибиотики и биостимуляторы.

В зависимости от назначения комбикорм вырабатывается трёх основных видов.

Полнорационный комбикорм (ПК) – полностью покрывает все потребности животных и птицы в питательных, биологически активных и минеральных веществах [4]. Используется ежедневно в качестве единственного комбикорма. Такой рацион используют в кормлении рыбы, кур, гусей, уток, кроликов, свиней, лошадей и молодняка других видов [6, 7, 8, 9]. Маркируется продукция индексами ПК.

Комбикорм-концентрат (К) не является самостоятельным кормом, а лишь дополнением к основному рациону. Такой комбикорм для животных не может использоваться в качестве единственного корма. Он отличается повышенным содержанием витаминов, микроэлементов, биологически активных веществ. Вырабатывается концентрат для животных всех производственных групп. Он дополняет корм необходимыми веществами, которых не хватает в местной кормовой базе. Маркируют состав буквой К [5].

Балансирующие кормовые добавки – белково-витаминная добавка (БВД), белково-витаминно-минеральные составы (БМВД), суперконцентраты представляют собой однородные смеси высокобелковых кормовых компонентов и полезных микродобавок, предназначенные для конкретных животных. В производстве добавок часто используют отходы маслоэкстракционной промышленности, травяную муку, дрожжи, БАВ, корма животного происхождения. Их используют в кормлении самостоятельно. Как правило, БМВД вводят в состав зернофуража в количестве от 20 % до 25 % от общей массы.

В отдельную группу выделяют премиксы. Это витаминно-минеральные добавки к комбикорму, которые содержат все необходимые для организма животных витамины, микро- и макроэлементы.

Механизм действия премиксов обусловлен наличием в них витаминов (А, Д, Е, К, С, группы В), микроэлементов (железа, меди, марганца, кобальта, йода, селена), макроэлементов (магния, серы), антиоксидантов (бутилокситолуола, сантохина), противомикробных препаратов (кормовые антибиотики), вещества, влияющие на усвояемость корма, предотвращающие ухудшение качества (ферменты, эмульгаторы, противокислители) в оптимальных количествах и соотношениях. В качестве наполнителей премиксов, как правило, используются измельченное зерно и продукты его переработки, а также порошкообразный жмых, шрот, кормовые дрожжи.

Кроме того, в кормлении сельскохозяйственных животных могут задействоваться БВД, молочнокислые кормовые добавки (МКД) и др., выполняющие в их жизни важнейшее значение.

В результате унификации кормов для животных важным требованием, которое становится все актуальнее в последнее время, является производство безопасных во всех отношениях комбикормов. Они не должны вредить здоровью самих животных, и не ухудшать здоровье людей, потребляющих животноводческую продукцию [1].

Целью настоящей работы являлась оценка общей токсичности комбикормов, поступивших в Испытательный центр ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (г. Казань), по выживаемости на тест-культурах и на виварных лабораторных животных (мыши, кролики).

**Материалы и методы.** Исследования проводили в 2018 г. в секторе токсикологических испытаний и секторе по испытаниям на микотоксины ИЦ ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». Анализ общей токсичности кормов, поступивших в ИЦ, определяли методами биотестирования (на простейших инфузориях *Stylonychia mytilus* и вивариумных животных – кроликах и мышах) согласно ГОСТ 31674-2012 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения токсичности» [2]. Первый метод относится к экспресс-методу, который позволяет определить токсичность за короткое время (в течение одного дня). Второй метод является основным (арбитражным), но его сроки проведения составляют несколько дней.

Концентрированные корма и кормовые добавки предварительно смешивали в концентрации согласно нормам ввода указанной в инструкции с образцами размолотого нетоксичного на 100 % зерна пшеницы. В качестве контроля был отобран комбикорм, который по результатам биотестирования показал себя на 100 % нетоксичным и не содержал кормовых добавок.

Предварительным этапом в оценки безвредности кормов использовался экспресс-метод на стилонихиях (*Stylonychia mytilus*). Степень токсичности экстрактов проб устанавливали по выживаемости простейших рода *Stylonychia mytilus* через 3 часа экспозиции в экстрактах исследуемых кормов.

Токсичность испытуемого корма определяли из расчета:

а) комбикорма для свиней:

- 1) от 80 % до 100 % выживаемости стилонихий – корм нетоксичный;
- 2) от 40 % до 79 % выживаемости стилонихий – корм слаботоксичный;
- 3) от 0 % до 39 % выживаемости стилонихий – корм токсичный.

б) комбикорма для других видов продуктивных и непродуктивных животных, птиц и рыб, фуражное зерно и продукты его переработки, концентрированные компоненты комбикормов:

- 1) от 70 % до 100 % выживаемости стилонихий – корм нетоксичный;
- 2) от 40 % до 69 % выживаемости стилонихий – корм слаботоксичный;
- 3) от 0 % до 39 % выживаемости стилонихий – корм токсичный.

Определение каждой пробы проводилось в пяти повторностях (пять мироаквариума).

Нетоксичным следует считать корм, если при параллельном биотестировании как водного раствора ацетонового экстракта, так и водного раствора испытуемого корма определено, что он нетоксичный. Нетоксичный корм дальнейшему исследованию не подлежит и используется по назначению без ограничений. Слаботоксичные и токсичные корма (хотя бы по одному из испытуемых экстрактов) направляются на биотестирование основными методами, а также на микологические, химико-токсикологические и бактериологические исследования.

Основным являлся метод постановки параллельных проб на мышах (острый опыт) и на кроликах (кожная проба). Способ биотестирования токсичности кормов на мышах заключался во внутрижелудочном введении полученных водных или ацетоновых экстрактов (в зависимости от результатов экспресс-теста) опытным животным. Наблюдение за мышами велось в течение 3 суток с последующим их диагностическим вскрытием и изучением патологоанатомической картины внутренних органов животных.

Дермонекротический эффект ацетоновых экстрактов образцов кормов исследовали путем их двухкратного нанесения с интервалом в 1 сутки на кожу кролика.

Результат учитывали на основании острого опыта на мышах и кожной пробы на кроликах. Корм считался нетоксичным, если он был отрицательным в обоих тестах, корм токсичный – положительный, хотя бы в одном тесте.

**Результаты исследований.** Результаты исследования по определению общей токсичности кормов на *Styloynchia mytilus* представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты исследований общей токсичности проб кормов на *Styloynchia mytilus*

Наименование пробы	Выживаемость на <i>Styloynchia mytilus</i> , %	Результат общей токсичности
1) Комбикорм КК-65-59 для молодняка КРС, от 6 до 12 месяцев	20,00±1,03	Токсичный
2) Комбикорм КК-60-50 для застойных коров	20,00±1,01	Токсичный
3) Комбикорм для рыб	24,00±0,09	Токсичный
4) Комбикорм для КРС, для телят до 4-х месяцев	59,00±1,04	Слаботоксичный
5) Комбикорм для КРС, для телят до 4-х месяцев, предстартер	57,00±1,06	Слаботоксичный
6) Комбикорм для рыб	23,00±1,02	Токсичный
7) Комбикорм полнорационный ПК-5-0 для бройлеров, предстартер	59,00±1,01	Слаботоксичный
8) Комбикорм полнорационный ПК-5-1 для бройлеров, стартер	39,00±1,03	Токсичный
9) Комбикорм полнорационный ПК-1-2-239 для родильного стада бройлеров	38,00±1,02	Токсичный
10) Комбикорм полнорационный СПК-1-1293 для свиней	30,00±1,04	Токсичный
11) Комбикорм полнорационный для откорма свиней (2 период)	24,00±1,01	Токсичный
12) Комбикорм № 60 для КРС (для высокопроизводительных коров)	22,00±1,04	Токсичный
13) Комбикорм № 64 для КРС (для низкопроизводительных коров)	22,00±1,02	Токсичный
14) Комбикорм № 65 для откорма КРС	35,00±1,03	Токсичный
15) Комбикорм № 66 для сухостойных коров	23,00±1,04	Токсичный
16) Комбикорм № 67 для КРС (36-120 дней)	22,00±1,01	Токсичный
17) Комбикорм № 61 для новотельных первотелок (от 0-35 дней)	23,00±0,09	Токсичный
18) Комбикорм № 63 для молодняка КРС	22,00±0,08	Токсичный
19) Комбикорм № 63 для телят КРС (от 4-х месяцев)	49,00±1,02	Токсичный
20) Комбикорм полнорационный для свиней ГСПК-4 (поросята в возрасте от 43-63 дней)	72,00±1,04	Слаботоксичный
21) Комбикорм полнорационный для откорма свиней ГСПК-7 (1 период)	69,00±1,02	Слаботоксичный
22) Комбикорм полнорационный для с.-х. птицы: МПК-1-1 для кур-несушек (от 2-3 недель)	37,00±1,03	Слаботоксичный
23) Комбикорм полнорационный для с.-х. птицы: ГПК-5-2 для бройлеров (от 0-15 дней)	37,00±0,09	Токсичный
24) Комбикорм полнорационный для с.-х. птицы: ГПК-2 для молодняка кур (от 0-3 недель)	32,00±0,08	Токсичный
25) Комбикорм-концентрат для КРС: КК-62 для телят (от 3-6 месяцев)	51,00±1,03	Слаботоксичный
26) Смесь кормовая	30,00±1,01	Токсичный
27) Комбикорм для рыб	46,00±1,04	Слаботоксичный
28) Комбикорм полнорационный для откорма свиней (1 период)	36,00±1,01	Токсичный
29) Комбикорм-концентрат для молочных коров в стойловый период	39,00±0,09	Токсичный
30) Комбикорм полнорационный для с.-х. птицы: МПК-4/2 для кур-несушек (от 21-47 недель)	41,00±1,01	Слаботоксичный
31) Кормосмесь для с.-х. животных	38,00±1,03	Токсичный
32) Комбикорм-концентрат для взрослых кроликов	27,00±0,09	Токсичный

Данные таблицы 1 показывают, что при биотестировании 32 проб корма на *Styloynchia mytilus* 23 (72 %) были токсичными и 9 (28 %) – слаботоксичными. Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что все анализируемые корма проявляли разную степень токсичности по отношению к тест-культурам. Исходя из полученных результатов, согласно ГОСТ 31674-2012, корма были направлены на дальнейшее исследование арбитражными методами на лабораторных животных.

Результаты исследования по определению общей токсичности кормов на белых мышях и на кроликах представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты исследований общей токсичности проб кормов на белых мышях (острый опыт) и кроликах (кожная проба)

Наименование пробы	Биопроба на белых мышях	Биопроба на кроликах	Результаты общей токсичности
1) Комбикорм КК-65-59 для молодняка КРС, от 6 до 12 месяцев	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
2) Комбикорм КК-60-50 для застойных коров	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
3) Комбикорм для рыб	Положительный	Положительный	Токсичный
4) Комбикорм для КРС, для телят до 4-х месяцев	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
5) Комбикорм для КРС, для телят до 4-х месяцев, предстартер	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
6) Комбикорм для рыб	Положительный	Положительный	Токсичный
7) Комбикорм полнорационный ПК-5-0 для бройлеров, предстартер	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
8) Комбикорм полнорационный ПК-5-1 для бройлеров, стартер	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
9) Комбикорм полнорационный ПК-1-2-239 для родильного стада бройлеров	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
10) Комбикорм полнорационный СПК-1-1293 для свиней	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
11) Комбикорм полнорационный для откорма свиней (2 период)	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
12) Комбикорм № 60 для КРС (для высокопроизводительных коров)	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
13) Комбикорм № 64 для КРС (для низкопроизводительных коров)	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
14) Комбикорм № 65 для откорма КРС	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
15) Комбикорм № 66 для сухостойных коров	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
16) Комбикорм № 67 для КРС (от 36-120 дней)	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
17) Комбикорм № 61 для новотельных первотелок (от 0-35 дней)	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
18) Комбикорм № 63 для молодняка КРС	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
19) Комбикорм № 63 для телят КРС (от 4-х месяцев)	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
20) Комбикорм полнорационный для свиней ГСПК-4 (поросята в возрасте от 43-63 дней)	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
21) Комбикорм полнорационный для свиней ГСПК-7 (1 период)	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
22) Комбикорм полнорационный для с.-х. птицы: МПК-1-1 для кур-несушек (от 2-3 недель)	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный

23) Комбикорм полнорационный для с.-х. птицы: ГПК-5-2 для бройлеров (от 0-15 дней)	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
24) Комбикорм полнорационный для с.-х. птицы: ГПК-2 для молодняка кур (от 0-3 недель)	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
25) Комбикорм-концентрат для КРС: КК-62 для телят (от 3-6 месяцев)	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
26) Смесь кормовая	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
27) Комбикорм для рыб	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
28) Комбикорм полнорационный для откорма свиней (1 период)	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
29) Комбикорм-концентрат для молочных коров в стойловый период	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
30) Комбикорм полнорационный для с.-х. птицы: МПК-4/2 для кур-несушек (от 21-47 недель)	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
31) Кормосмесь для с.-х. животных	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный
32) Комбикорм-концентрат для взрослых кроликов	Отрицательный	Отрицательный	Не токсичный

Данные таблицы 2 показывают, что из 32 проб только 2 образца комбикорма для рыб показали свою токсичность по отношению к лабораторным животным. Комбикорма для рыб при постановке острого опыта вызвали гибель мышей, а при вскрытии отмечалось геморрагическое воспаление желудочно-кишечного тракта. Нанесение на кожу ацетоновых экстрактов комбикормов сопровождалось гиперемией, сохраняющейся более 3 суток, уплотнением и отеком кожи.

Таким образом, при первичном скрининге на *Styloynchia mytilus* установлена разная степень токсичности исследуемых кормов при отсутствии их токсического действия в 30 образцах при биотестировании на мышах (острый опыт) и на кроликах (кожная проба). Два образца комбикорма для рыб показали свою токсичность как по отношению к тест-культурам, так и при постановке биопробы на лабораторных животных. Результаты исследования позволяют утверждать о возможном влиянии кормовых добавок, входящих в состав комбикормов, на выживаемость тест-культур. Высокая чувствительность тест-культур к компонентам корма, вероятно, всего связана с оптимизацией рациона питания биоактивными веществами. Следовательно, простейшие обладают более выраженной чувствительностью в отношении к кормовым добавкам, по сравнению с их низким воздействием на пищеварительную систему и на кожу теплокровных животных.

**Заключение.** В результате проведенных исследований установлено, что проанализированные пробы кормов на общую токсичность арбитражными методами на мышах (острый опыт) и на кроликах (кожная проба) оценивались в основном как нетоксичные, за исключением двух образцов комбикорма для рыб.

Скрининговый метод по выживаемости на *Styloynchia mytilus* свидетельствует о слабом или высоком уровне токсичности кормов на организмы простейших.

Однако при решении вопроса о возможном использовании кормов на корм сельскохозяйственным животным необходимо учитывать результаты не только скрининговых и арбитражных методов, но и микологических, химико-токсикологических и бактериологических исследований для исключения возможной хронической интоксикации.

### Литература

1. Галяутдинова, Г. Г. Об исследованиях кормов на общую токсичность в Испытательном центре ФГБНУ «ФЦТРБ–ВНИВИ» / Г. Г. Галяутдинова, А. Р. Валиев, З. Х. Сагдеева, О. В. Шлямина // Ученые записки КГАВМ им. Н. Э. Баумана. – 2022. – Т. 251, № 3 – С. 84–89.
2. ГОСТ 31674–2012 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности. – М. : Стандартинформ, 2012. – 72 с.
3. ГОСТ Р 51899–2002 Государственный стандарт Российской Федерации. Комбикорма гранулированные. Общие технические условия. – М. : Стандартинформ, 2003. – 11 с.
4. ГОСТ 54379–2011 Национальный стандарт Российской Федерации. Крупа комбикормовая. Технические условия. – М. : Стандартинформ, 2012. – 13 с.
5. ГОСТ 9268–2015 Межгосударственный стандарт. Комбикорма-концентраты для крупного рогатого скота. Технические условия. – М. : Стандартинформ, 2016. – 20 с.

6. ГОСТ 34109–2017 Межгосударственный стандарт. Комбикорма полнорационные для свиней. Общие технические условия. – М. : Стандартиформ, 2019. – 24 с.
7. ГОСТ 18221–2018 Межгосударственный стандарт. Комбикорма полнорационные для сельскохозяйственной птицы. Общие технические условия. М. : Стандартиформ, 2019. – 26 с.
8. ГОСТ 32897–2014 Межгосударственный стандарт. Комбикорма для пушных зверей, кроликов и нутрий. Общие технические условия. – М. : Стандартиформ, 2016. – 32 с.
9. ГОСТ 10385–2014 Межгосударственный стандарт. Комбикорма для рыб. Общие технические условия. – М. : Стандартиформ., 2016. – 26 с.
10. Егоров, В. И. Сочетанный Т-2 и дельтаметрин токсикоз / В. И. Егоров, Г. Г. Галяутдинова, А. В. Иванов // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2010. – № 1. – С. 190–192.
11. Егоров, В. И. Современные пестициды для защиты животных и растений / В. И. Егоров, Н. Н. Жестков, Г. Г. Галяутдинова // Сборник докладов Международной научно-практической конференции «Биотехнология: токсикологическая, радиационная и биологическая безопасность» (к 50-летию со дня образования ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»). – Казань, 2010. – С. 49–53.
12. Макаева, А. Р. Мониторинг питательной ценности и химической безопасности основных кормов Республики Татарстан по результатам исследований, выполненных в 2019 году / А. Р. Макаева, О. В. Шлямина, И. М. Фицев // Бултеровские сообщения. – 2020 – Т. 62, № 4 – С. 123–128.
13. Маланьев, А. В. Токсикологическая оценка кормов из Республики Мордовия на наличие пестицидов и азотсодержащих соединений / А. В. Маланьев, Д. В. Алеев, Г. Г. Галяутдинова, В. И. Егоров, Е. Н. Иванов // Ветеринарный врач. – 2019. – № 2. – С. 43–49.
14. Тремасов, М. Я. Микотоксины – реальная угроза продовольственной безопасности / М. Я. Тремасов, А. В. Иванов, Е. Ю. Тарасова // Вестник ветеринарии. – 2013. – № 2 (65). – С. 78–80.

### References

1. Galyautdinova G.G. About studies of food for general toxicity in the Testing center of the FSBSI "FCTRBS-RRVI" / Galyautdinova G.G., Valiev A.R, Sagdeeva Z.KH., Shlyamina O.V. // Scientific notes of the Kazan state academy of veterinary medicine im. N.E. Bauman – 2022 – V.251, № 3, p. 84-89
2. GOST 31674–2012 Feed, compound feed, compound feed raw materials. Methods for determining general toxicity. – М. : Standartinform, 2012. – 72 p.
3. GOST R 51899–2002 State standard of the Russian Federation. Compound feeds granulated. General technical conditions. – М. : Standartinform, 2003. – 11 p.
4. GOST 54379–2011 National standard of the Russian Federation. Mixed feed grits. Technical conditions. – М. : Standartinform, 2012. – 13 p.
5. GOST 9268–2015 Interstate standard. Compound feed concentrates for cattle. Technical conditions. – М. : Standartinform, 2016. – 20 p.
6. GOST 34109–2017 Interstate standard. Complete feed for pigs. General technical conditions. – М. : Standartinform, 2019. – 24 p.
7. GOST 18221–2018 Interstate standard. Complete feed for poultry. General technical conditions. М. : Standartinform, 2019. – 26 p.
8. GOST 32897–2014 Interstate standard. Compound feed for fur animals, rabbits and nutria. General technical conditions. – М. : Standartinform, 2016. – 32 p.
9. GOST 10385–2014 Interstate standard. Compound feed for fish. General technical conditions. – М. : Standartinform, 2016. – 26 p.
10. Egorov, V. I. Combined T-2 and deltamethrin toxicosis / V. I. Egorov, G. G. Galyautdinova, A. V. Ivanov // Immunopathology, allergology, infectology. – 2010. – No. 1. – P. 190-192.
11. Egorov, V. I. Modern pesticides for the protection of animals and plants / V. I. Egorov, N. N. Zhestkov, G. G. Galyautdinova // Collection of reports of the international scientific-practical conference «Biotechnology: toxicological, radiation and biological safety» (to the 50th anniversary of the foundation of the Federal State Budgetary Scientific Institution "FTsTRB-VNIVI"). – Kazan, 2010. – P. 49–53.
12. Makaeva, A. R. Monitoring of the nutritional value and chemical safety of the main feeds of the Republic of Tatarstan based on the results of studies performed in 2019 / A. R. Makaeva, O. V. Shlyamina, I. M. Fitsev // Butlerov Communications. – 2020. – T. 62, No. 4. – P. 123-128.
13. Malaniev, A. V. Toxicological assessment of feed from the Republic of Mordovia for the presence of pesticides and nitrogen-containing compounds / A. V. Malaniev, D. V. Aleev, G. G. Galyautdinova, V. I. Egorov, E. N. Ivanov // The Veterinarian. – 2019. – No. 2. – P. 43–49.
14. Tremasov, M. Ya. Mycotoxins – a real threat to food security / M. Ya. Tremasov, A. V. Ivanov, E. Yu. Tarasova // Bulletin of Veterinary Medicine. – 2013. – No. 2 (65). – P. 78–80.



Ветеринарный врач. 2023. № 2. С. 17 – 22.  
The Veterinarian. 2023; (2): 17 – 22

Научная статья  
УДК 343.148.27  
DOI: 10.33632/1998-698X\_2023\_2\_17

### Пестициды в пчелином мёде и продуктах пчеловодства

Ирина Вячеславовна Куш<sup>1</sup>, Дамир Исмаилович Удавлиев<sup>2</sup>, Антон Лутаевич Баиров<sup>3</sup>, Артём Игоревич Грудев<sup>3</sup>, Елена Геннадиевна Шубина<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии - филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко Российской академии наук» (ВНИИВСГЭ – ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН), Москва, Россия.

<sup>2</sup>ФГБУ ВО Российский биотехнологический университет «РОСБИОТЕХ», Москва, Россия.

<sup>3</sup>ФГБУ Федеральный центр охраны здоровья животных (ФГБУ ВНИИЗЖ), Москва, Россия.

Автор ответственный за переписку: Ирина Вячеславовна Куш, [i.kusch@mail.ru](mailto:i.kusch@mail.ru)

#### Аннотация.

Пестициды представляют собой ядовитые вещества для уничтожения возбудителей болезней растений; паразитов; сорняков и иных вредителей, без которых не обходится на сегодняшний день сельскохозяйственная отрасль. Однако при неправильном применении ядохимикатов страдают нецелевые насекомые, такие как медоносные пчёлы, что приводит к гибели их колоний и попаданию пестицидов в продукты пчеловодства.

В статье представлены результаты лабораторного мониторинга остатков запрещённых и вредных веществ в продуктах пчеловодства, охватывающие данные в отношении пестицидов и иных ядохимикатов из 19 филиалов ФГБУ ВНИИЗЖ.

Рассмотрены основные методики, применяемые для осуществления пищевого мониторинга пчеловодческой продукции на территории Российской Федерации.

**Ключевые слова:** пчелиный мёд, пестициды, ГХ, ГЖХ, ГХ-МС, ТСХ, мониторинг, ветеринарно-санитарная экспертиза.

### Pesticides in bee honey and bee products

Irina V. Kushch<sup>1</sup>, Damir I. Udavliev<sup>2</sup>, Anton L. Bairov<sup>3</sup>, Artem I. Grudev<sup>3</sup>, Elena G. Shubina<sup>3</sup>

<sup>1</sup>All-Russian Research Institute of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology - Branch of the Federal State Budgetary Scientific Institution "Federal Research Center - All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K. I. Skryabin and Ya R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences", Russia, Moscow, [i.kusch@mail.ru](mailto:i.kusch@mail.ru)

<sup>2</sup>FGBU VO Russian Biotechnological University, Russia, Moscow

<sup>3</sup>FGBU Federal Center for Animal Health, Russia, Moscow

Corresponding author: Irina Vyacheslavovna Kushch, [i.kusch@mail.ru](mailto:i.kusch@mail.ru)

**Abstract.** Pesticides are poisonous substances for the destruction of plant pathogens; parasites; weeds and other pests, without which the agricultural industry cannot do today. However, non-target insects, such as honey bees, are harmed when pesticides are used incorrectly, leading to the death of their colonies and the ingress of pesticides into bee products.

The article presents the results of laboratory monitoring of residues of prohibited and harmful substances in bee products, covering the results in relation to pesticides and other pesticides from 19 branches of the Central scientific and methodological veterinary laboratory.

The main methods used for the implementation of food monitoring of beekeeping products on the territory of the Russian Federation are considered.

**Keywords:** bee honey, pesticides, GC, GLC, GC-MS, TLC, monitoring, veterinary and sanitary examination.

**Введение.** Пестициды получили широкое распространение в 40-х годах прошлого столетия и применялись повсеместно в сельском хозяйстве для защиты продукции отрасли от вредителей и сорняков. В обширную группу пестицидов входят гербициды, инсектициды, фунгициды и зооциды. Пестициды являются высокотоксичными веществами, которые негативно влияют на здоровье человека и животных. Ежегодно используется более миллиона тонн пестицидов, причём большая часть из них – в сельском хозяйстве. Более половины объёмов продаж на мировом рынке пестицидов – приходится на гербициды. На сегодняшний день разработаны и широко применяются нанопестициды, неоникотиноиды и ингибиторы метаболизма липидов, которые относятся к 4–5 поколению пестицидов [1, 7, 9, 10].

Однако широкое применение ядохимикатов затрагивает нецелевые виды насекомых и оказывает на них пагубное влияние. При неумелом и нерациональном применении ядохимикатов для обработки сельскохозяйственных растений создаётся большая угроза отравления и массовой гибели медоносных пчёл. Это ведёт к нарушению опыления энтомофильных культур, что в свою очередь приводит к понижению их урожайности, а также к недополучению таких ценных продуктов, как мёд и воск [5, 6].

С развитием химического метода защиты растений и увеличением ассортимента применяемых препаратов фактов отравления и гибели пчёл становится всё больше и больше. Особенно участилось отравление пчёл в связи с применением хлорорганических и фосфорорганических соединений, используемых в больших количествах для обработки сельскохозяйственных культур и обладающих выраженными контактными свойствами [2, 4, 11].

Следует отметить, что пчелиная колония не всегда погибает при отравлении ядохимикатами и или иными химическими веществами. На это обстоятельство влияет количество попавшего яда, способ получения (контактный, кишечный и т.д.), длительность обработки и т.д. [5, 6].

Для идентификации зараженной пчеловодческой продукции применяются преимущественно хроматографические методы исследования. Хроматография в свою очередь разделяется на тонкослойную, газовую, жидкостную и газо-жидкостную с применением хроматографов масс-детекторов.

Наиболее часто применяется тонкослойная хроматография, которая обладает существенными минусами: во-первых, метод считается небезопасным, а во-вторых, неточным в силу низкой чувствительностью и интерпретация результатов исследования весьма расплывчата. Однако существенными плюсом метода является относительная дешевизна и простота.

ГХ-МС/МС или ВЭЖХ-МС/МС применяются для исследования широкого спектра пестицидов и ядохимикатов, так как приборы обладают высокой чувствительностью ко всем видам пестицидов, возможностью одновременно исследовать разные группы и производные пестицидов в пищевых продуктах, кормах, зерне и пчеловодческой продукции. Однако на территории Российской Федерации не разработаны методики для определения ядохимикатов в продукции пчеловодства.

Цель работы заключалась в проведении лабораторного мониторинга по определению пестицидов и ядохимикатов в пчеловодческой продукции и применяемым методам обнаружения недоброкачественной продукции, а также выявления оптимальных методов исследования.

**Материалы и методы.** Для проведения аналитического исследования остатков запрещённых и вредных веществ в продуктах пчеловодства использованы отчётные данные (Форма «4-вет» годовая), предоставленные государственными ветеринарными лабораториями 19 субъектов Российской Федерации в ФГБУ ВНИИЗЖ за период с 2015 по 2021 годы.

Лабораторные испытания образцов мёда, отобранных в различных климатических зонах страны, проводились в соответствии с действующим Федеральным законом от 02.01.2000 № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов», статьей 14 «Мониторинг качества и безопасности пищевых продуктов, здоровья населения» и постановлением Правительства Российской Федерации от 22.11.2000 № 883 «Об организации и проведении мониторинга качества, безопасности пищевых продуктов и здоровья населения».

**Результаты исследований.** Анализ показал, что государственными ветеринарными лабораториями Российской Федерации за период с 2015 по 2021 годы проведено более 30 тыс. лабораторных исследований проб мёда и продуктов пчеловодства с целью определения пестицидов и иных ядохимикатов. Испытания образцов выполнены с применением различных методов: ТСХ, ГХ, ГЖХ, ГХ-МС, ВЭЖХ-МС и т.д. Результаты лабораторного мониторинга остатков запрещённых и вредных веществ в продуктах пчеловодства представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Результат пищевого мониторинга пчеловодческой продукции – определение пестицидов и агрохимикатов

Показатель	Количество образцов		
	всего	положительных	отрицательных
<b>Результаты исследований за 2015 год</b>			
ГХЦГ (α, β, γ-изомеры)	331	0	331
ДДТ, ДДД, ДДЭ	166	0	166
Фунгициды	3	0	3

Показатель	Количество образцов		
	всего	положительных	отрицательных
ФОС	89	0	89
Пиретроиды	42	0	42
<b>Итого:</b>	<b>631</b>	<b>0</b>	<b>631</b>
<b>Результаты исследований за 2016 год</b>			
ГХЦГ (α, β, γ-изомеры)	219	0	219
ДДТ и его метаболиты	224	0	224
Пиретроиды	20	0	20
ФОС	106	0	106
<b>Итого:</b>	<b>565</b>	<b>0</b>	<b>565</b>
<b>Результаты исследований за 2017 год</b>			
ГХЦГ (α, β, γ-изомеры)	676	0	676
Пиретроиды	20	0	20
ДДТ и его метаболиты	667	0	667
ФОС	34	0	24
Пестициды	58	0	58
<b>Итого:</b>	<b>1455</b>	<b>0</b>	<b>1455</b>
<b>Результаты исследований за 2018 год</b>			
Пиретроиды	6	0	6
ГХЦГ (α, β, γ-изомеры)	1097	0	1097
ДДТ и его метаболиты	1092	0	1092
ФОС	14	0	14
Пестициды	144	0	144
<b>Итого:</b>	<b>2353</b>	<b>0</b>	<b>2353</b>
<b>Результаты исследований за 2019 год</b>			
ГХЦГ (α, β, γ-изомеры)	4305	2	4303
ДДТ, ДДД, ДДЭ	4137	1	4136
ФОС	716	1	715
Пиретроиды	217	0	217
Инсектоакарициды	369	0	369
Пестициды	575	0	575
<b>Итого:</b>	<b>10319</b>	<b>4</b>	<b>10315</b>
<b>Результаты исследований за 2020 год</b>			
ДДТ, ДДД, ДДЭ	1639	1	1638
ГХЦГ (α, β, γ-изомеры)	1759	1	1758
Пестициды	1668	1	1667
ФОС	57	0	57
Полипептиды	218	0	218
Инсектоакарициды	383	0	383
<b>Итого:</b>	<b>5724</b>	<b>3</b>	<b>5721</b>
<b>Результаты исследований за 2021 год</b>			
Пестициды	6052	5	6047
ДДТ, ДДД, ДДЭ	1772	0	1772
ГХЦГ (α, β, γ-изомеры)	1715	0	1715
Инсектоакарициды	334	0	334
ФОС	2	0	2
<b>Итого:</b>	<b>9875</b>	<b>5</b>	<b>9870</b>
<b>Всего проведено исследований, 2015–2021 гг.</b>	<b>30922</b>	<b>12</b>	<b>30910</b>

Примечание: «положительные» — выявление нарушения; «отрицательные» — нарушения не выявлено.

В период с 2015 по 2021 годы было проведено более 30 тыс. исследований по определению пестицидов и ядохимикатов в пчеловодческой продукции на территории Российской Федерации. В указанный временной промежуток было обнаружено 12 положительных проб, что процентном отношении составляет 0,04 %. Так, в 2019 году было обнаружено 4 положительных образца меда, в которых были обнаружены: 2 пробы, содержащие ГХЦГ ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - изомеры), одна проба ДДТ и одна проба, содержащая пестицид, относящийся к группе ФОС. В 2020 году были обнаружены ГХЦГ, ДДТ и инсектицид т-Флувалинат. В 2021 году было обнаружено 5 положительных проб, из которых 4 относятся к пестицидам и не распределены по группам, а также одна проба инсектицида т-Флувалината.

Также из таблицы 1 следует резкое увеличение количества испытаний по определению недоброкачественной пчеловодческой продукции в отношении присутствия ядохимикатов в 2019 году. Однако в 2020 году произошло резкое снижение количества испытаний: в 2 раза по отношению к 2019 году, что связано со сложной эпидемиологической обстановкой как на территории Российской Федерации, так и во всем мире. В 2021 году количество испытаний было восстановлено до уровня 2019 года.

В таблице 2 приведены данные лабораторного мониторинга по применяемым методам и методикам исследования в период с января 2015 по декабрь 2021 года.

Таблица 2 – Анализ нормативных документов и методов исследования

Год	Нормативный документ	Методика проведения испытания	Количество испытаний
2015	МУ №117-98; МУ № 3019-84 МУК 4.1.1387-03; МУ № 2142-80 ФР.1.31.2010.07610 МУ 3222-85 МУ № 2473-81 МУ 4704-88 МУ № 1792-77 МУК 4.1.1023-2001 ГОСТ 31983-2012	ВЭЖХ	3
		ТСХ	166
		ГЖХ	167
		ГХ	149
		ГХ-МС	97
		Метод не указан	44
		2016	МУ 2142-80 МУ 2473-81 МУ № 3019-84 МУ № 3222-85 МУ 4362-87 МУ 4704-88 МУ № 6093-91 МУК 4.1.1023-01 МУК 4.1.1387-03 ФР.1.31.2010.07610
ГХ	127		
ГЖХ	239		
ВЭЖХ	2		
ГХ-МС	30		
ГХ-ДЭВ	1		
Метод не указан	2		
2017	МУ 2142-80 МУ 3222-85 МУ по определению микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде. Части №5-25, 1976-1997 гг. МУ 5044-89 МУК 4.1.1023-01 ГОСТ Р 52473-2005 ФР.1.31.2010.07610		
		ГХ	38
		ГЖХ	229
		ГХ-МС	21
		ААС	1
		Метод не указан	2
2018	МУ 2142-80 МУ 3151-84 МУ 3222-85 МУ 4704-88 МУ 5044-89 ВМУ 6093-91 ФР.1.31.2010.07610	ТСХ	1625
		ГХ	112
		ГЖХ	540
		ГХ-МС	6
		Метод не указан	15
		2019	МУ 2142-80 МУ 3151-84
ГХ	271		
ГЖХ	2427		

	МУ по определению микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде. Части №5-25, 1976-1997 гг. МУ 3222-85 МУ 4380-87 МУ А-1/054 МУК 4.1.1430-03 МУК 4.1.2662-10 ФР.1.31.2010.07610	ГХ-МС	580
		ИФА	1
		ВЭЖХ	1
		Качественная реакция	6
		СВЖХ – ВМС	6
		Метод не указан	7
2020	МУ 2142-80, МУ 3151-84, МУ 3222-85, МУ по определению микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде. Сб. Госагропрома и МЗ СССР, 1989г., МУ А-1/054, МУ А 1/055, ФР.1.31.2010.07610, DIN EN 15662:2018	ТСХ	2442
		ВЭЖХ	2
		ВЭЖХ-МС/МС	341
		ГХ-ДЭЗ	32
		ГЖХ	1162
		ГХ	214
		Диско-диффузионный метод (ДДМ)	6
		СВЖХ-ВП/МС	201
		Физико-химический	2
		ГХ-МС	1097
2021	МУ 2142-80 МУ 3151-84 МУ А-1/054 МУ А 1/055 ФР.1.31.2010.07610 DIN EN 15662:2018	Асс	1
		ВЭЖХ	199
		ТСХ	2715
		ГХ	219
		ГХ-ДЭЗ	2
		ВЭЖХ-МС	2970
		ГХ-МС	2458
		ГЖХ	652
		СВЖХ-ВП/МС	375
		Физико-химический	107
		Метод не указан	1

Из таблицы 2 следует, что определение пестицидов и ядохимикатов в пчеловодческой продукции проводится по нормативам, разработанным в 80-х годах XX в.

Основными методами для определения пестицидов до 2020 года являются методы тонкослойной хроматографии (ТСХ), газовой и газожидкостной хроматографии (ГХ и ГЖХ). В 2020–2021 годах к основным методам определения поллюантов добавляются газовая и высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-детекторами.

Анализ мониторинга остатков запрещённых и вредных веществ по определению пестицидов и ядохимикатов показал, что применяемые методы и методики исследования не способны выявлять недоброкачественные пчеловодческие продукты. Данное обстоятельство связано с тем, что применяются устаревшие методики определения пестицидов первых поколений, в то время как разрабатываются и применяются пестициды и ядохимикаты уже 4 и 5 поколения. Что в свою очередь чревато попаданием на внутренний и внешний рынок недоброкачественных пчеловодческих продуктов.

**Заключение.** На территории Российской Федерации в период с 2015 по 2021 годы было проведено более 30 тыс. исследований по определению пестицидов и ядохимикатов, процент обнаружения недоброкачественной продукции составил 0,04 %, что эквивалентно 12 пробам.

Основными методами для определения пестицидов в пчеловодческой продукции являются метод тонкослойной хроматографии, а также ГХ-МС и ВЭЖХ-МС, для которых не разработаны методики для определения ядохимикатов.

На данный момент свойства пчелиного мёда исследуются при помощи устаревших лабораторных методов, которые были разработаны и применялись в 80-х годах. В настоящее время данные методы малоактуальны, так как с их помощью не представляется возможным определение пестицидов нового поколения, включающих в себя около 300 действующих веществ – гербицидов, 250 действующих веществ

– инсектоакарицидов и нематоцидов, 150 действующих веществ – фунгицидов. Обнаружение пестицидов нового поколения является невозможным без разработки новых методов и способов исследования. В связи с этим возникает необходимость актуализации уже имеющихся методов и разработки новых методик для определения пестицидов в пчеловодческой продукции.

### Литература

1. Белан, С. Р. Новые пестициды. Справочник / С. Р. Белан, А. Ф. Грапов, Г.М. Мельникова. – М. : Грааль, 2001. – С. 195.
2. Бутко, М. П. / Требования по обеспечению безопасности и ветеринарно-санитарная экспертиза мёда пчелиного / М. П. Бутко, А. М. Смирнов, А. С. Герасимов. – М. : ИД «Науч. б-ка», 2019. – С. 562.
3. Ганиев, М. М. Химические средства защиты растений / М. М. Ганиев, В. Д. Недорезков. – М. : КолосС, 2006. – 248 с.
4. Стойкие органические загрязняющие вещества (СОЗ) в организме человека: опыт России и бывших советских республик / Ю. П. Гумовская, А. Н. Гумовский, В. Ю. Цыганков, А. В. Полевщиков. – Владивосток: Изд-во Дальневост. федерал. ун-та, 2020. – С. 283-316. – DOI:10.24866/7444-4891-2/283-316.
5. Илюшина, Н. А. Системная оценка генотоксичности пестицидов в Российской Федерации : специальность 14.02.01 «Гигиена» : дис. ... д-ра биол. наук / Илюшина Наталья Алексеевна ; Место защиты: Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана. – М., 2020. – С. 291.
6. Какпаков, В. Т. Пчела и окружающая среда / В. Т. Какпаков // РЖ Пчеловодство. – 1995. – № 2. – С. 43–47.
7. Лухменов, В. П. Обоснование направления создания пестицидов нового поколения // Известия ОГАУ. – 2006. – № 9. – С. 56–59.
8. Мельников, Н. Н. Пестициды. Химия, технология и применение. – М. : Химия, 1987. – 712 с.
9. Страновой обзор производства и использования особо опасных пестицидов в России. – М. : Центр «Эко-Согласие», 2020. – 45 с.
10. Тсатсакис, А. М. Современные токсикологические, аналитические и модификационные аспекты ксенобиотиков (пестицидов, наркотиков и медицинских препаратов) : специальность 15.00.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : дис. ... д-ра биол. наук / Тсатсакис Аристидис Михаил ; Рос. ун-т дружбы народов (РУДН). – М., 2005. – С. 198.
11. Цыганков, В. Ю. «Грязная дюжина» Стокгольмской конвенции. Химия и токсикология стойких органических загрязняющих веществ (СОЗ) : обзор литературы. – Владивосток : Изд-во Дальневост. федерал. ун-та, 2020. – С. 12-61. – DOI:10.24866/7444-4891-2/12-61.

### References

1. Belan, S. R. New pesticides. Handbook / S. R. Belan, A. F. Grapov, G.M. Melnikova. — M. : Grail, 2001.
2. Butko, M. P. Requirements for safety and veterinary and sanitary examination of bee honey / M. P. Butko, A. M. Smirnov, A. S. Gerasimov. – M. : PHouse «ID Scientific Library», 2019. – P. 562.
3. Ganiev, M. M. Chemical plant protection products / M. M. Ganiev, V. D. Nedorezkov. – M. : KolosS, 2006. – 248 p.
4. Persistent organic pollutants (POPS) in the human body: the experience of Russia and the former Soviet Republics / Yu. P. Gumovskaya, A. N. Gumovsky, V. Yu. Tsygankov, A. V. Polevshchikov. – Vladivostok : Publishing House of the Far Eastern Federal. un-ta, 2020. – P. 283–316. – DOI:10.24866/7444-4891-2/283-316.
5. Ilyushina N.A. System assessment of genotoxicity of pesticides in the Russian Federation, dissertation of Doctor of Medical Sciences: 02/14/2011 / Ilyushina Natalia Alekseevna. – M., 2020. – 291 p.
6. Какпаков, В. Т. The bee and the environment //RZH. Beekeeping. – 1995. – No 2. – P. 43–47.
7. Likhmenov, V. P. Justification of the direction of creation of pesticides of a new generation // Izvestiya OGAU. – 2006. – No 9. – P. 56–59
8. Melnikov, N. N. Pesticides. Chemistry, technology and application. – M.: Chemistry, 1987. – 712 p.
9. Country review of the production and use of especially dangerous pesticides in Russia. – M. : Eco-Consent Center, 2020. – 45 p.
10. Tsatsakis, A. M. Modern toxicological, analytical and modification aspects of xenobiotics (pesticides, drugs and medicines) : dissertation of Doctor of Biological Sciences : 15.00.02 / Tsatsakis Aristidis Mikhail. – M., 2005. – 198 p.
11. Tsygankov, V. Yu. «Dirty dozen» of the Stockholm Convention. Chemistry and Toxicology of Persistent Organic Pollutants (POPS) : Literature Review. – Vladivostok : Publishing House of the Far Eastern Federal. un-ta, 2020. – P. 12–61. – DOI:10.24866/7444-4891-2/12-61.

Ветеринарный врач. 2023. № 2. С. 23 – 27.  
The Veterinarian. 2023; (2): 23 – 27

Научная статья  
УДК 619: 636:619:614:648.6  
DOI: 10.33632/1998-698X\_2023\_2\_23

### Изучение антимикотической активности веществ в отношении дерматофитов рода *Microsporium*

Ринат Салаватович Мухаммадиев, Рифкат Расимович Мусин, Валентина Юрьевна Титова, Анна Михайловна Тремасова, Евгений Владимирович Скворцов

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», Казань, Россия  
Автор, ответственный за переписку: Ринат Салаватович Мухаммадиев, tanirtashir@mail.ru

**Аннотация.** Проведено изучение антимикотической активности веществ бензоата натрия, тимола, бензотриазола, экстракта сныти и экстракта чистотела в сравнении с широко применяемыми на практике противогрибковыми средствами хлорнитрофенолом, тербинафином, флуконазолом, нафтифином, клотримазолом, 2-меркаптобензтиазолом в отношении дерматофитов из рода *Microsporium*. Методом двукратных серийных разведений определили прямую антимикотическую активность тестируемых веществ в диапазоне концентрации 0,098-100 мкг/мл. Установлено, что большинство тестируемых веществ были способны подавлять рост изолятов дерматофитов *Microsporium canis* и *Microsporium gypseum*. Наиболее выраженным антимикотическим действием в отношении изучаемых изолятов грибов обладали тимол и клотримазол, для которых значения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) составил 6,25 мкг/мл. Оценка чувствительности дерматофитов из рода *Microsporium* к активным веществам показало, что изолят *M. canis* был чувствителен ко всем тестируемым веществам. Изолят *M. gypseum* был чувствителен к тимолу, клотримазолу, хлорнитрофенолу, тербинафину, нафтифину, 2-меркаптобензтиазолу, экстракту чистотела и обладал устойчивостью к экстракту сныти. Полученные результаты открывают перспективы дальнейшего исследования тимола и его применения в качестве основного активного вещества лекарственных средств для наружного лечения микроспорийной инфекции.

**Ключевые слова:** дерматофиты, *p. Microsporium*, действующие вещества, антимикотическая активность, чувствительность к действующим веществам

#### A study of antimycotic activity substances against dermatophytes genus *Microsporium*

Rinat S. Muhammadiev, Rifkat R. Musin, Valentina Y. Titova, Anna M. Tremasova, Evgeny V. Skvortsov

Federal State Budgetary Scientific Institution «Federal Center for toxicological, radiation, and biological safety», Kazan, Russia.

Corresponding author: Rinat Salavatovich Muhammadiev, tanirtashir@mail.ru

**Abstract.** A study of antimycotic activity against dermatophytes *Microsporium* genus of substances sodium benzoate, thymol, benzotriazole, gout extract and celandine extract was conducted in comparison with the widely used antifungal agents chlornitrophenol, terbinafine, fluconazole, naftifine, clotrimazole, 2-mercaptobenzthiazole. Antimycotic activity substances were determined in concentration range of 0.098–100 µg/ml by method of double serial dilutions. It was found that most of substances were able to inhibit growth of isolates of *Microsporium canis* and *Microsporium gypseum*. Thymol and clotrimazole had the most pronounced antimycotic effect against fungal isolates, for which minimum inhibitory concentration (MIC) was 6.25 µg/ml. Evaluation of sensitivity dermatophytes *Microsporium* genus to the substances showed that *M. canis* isolate was sensitive to all tested substances. Isolate of *M. gypseum* was sensitive to thymol, clotrimazole, chlornitrophenol, terbinafine, naftifine, 2-mercaptobenzthiazole, celandine extract and was resistant to celandine extract. Obtained research results open up prospects for further study thymol and its use as main active substance in the drugs for external treatment of microsporial infection.

**Keywords:** dermatophytes, *Microsporum*, active substances, antimycotic activity, sensitivity to active substances

**Введение.** Согласно данным Международного общества по медицинской и ветеринарной микологии (The International Society for Human and Animal Mycology) в последние годы наблюдается повышение количества штаммов возбудителей дерматофитозов, проявляющие резистентность к применяемым в ветеринарии противогрибковым средствам [7, 9, 13]. Наиболее патогенным и распространенным среди них являются микроскопические грибы из рода *Microsporum*, которые вызывают у многих животных поверхностную форму микроспории [1, 9]. Дерматофиты из рода *Microsporum* – это группа патогенных плесневых грибов семейства *Arthrodermataceae* способные синтезировать протеазы и кератиназы для гидролиза кератина кожи и ее придатков (волосы, когти, шерсти), и использования продуктов их гидролиза в качестве источника питания [12]. Они продуцируют споры (макро- и микроконидии), обладающие устойчивостью к высоким и низким температурам, а также жизнеспособностью в течение длительного периода времени [14].

Возбудители микроспории выявлены у всех видов сельскохозяйственных животных. Чаще всего они обнаруживаются у молодых особей или животных со слабым иммунитетом [12, 14]. Эти микромицеты, проникнув в роговой слой эпидермиса и придатки кожи животных, продуцируют экзотоксины и гидролитические ферменты, разрушающие более глубокие слои кожи и ее производных, и служат причиной воспаления и патологических изменений их пораженных участков [6, 14].

Наиболее распространенными возбудителями микроспории у сельскохозяйственных животных являются виды *Microsporum canis*, *Microsporum gypsum*, *Microsporum nanum* и *Microsporum equinum* [8, 12]. Грибы *M. gypsum* и *M. canis* поражают преимущественно лошадей и свиней, *M. equinum* – лошадей, *M. nanum* – свиней. Животные, являющиеся носителями этих патогенов, могут быть источниками заражения не только животных, но и человека [5, 12]. Поэтому заболеваемость микроспорией сельскохозяйственных животных и людей находится в тесной взаимосвязи, и для решения проблемы распространения микроспории необходимо объединение усилий ветеринарных и медицинских специалистов.

Несмотря на разнообразие существующих специфических лекарственных средств для лечения и профилактики микроспории в ветеринарии [4, 7, 13], полностью искоренить данное заболевание у сельскохозяйственных животных до сегодняшнего времени не удается. В связи с этим поиск новых биологически активных соединений с антимикотической активностью в отношении дерматофитов рода *Microsporum* является актуальной проблемой современной ветеринарной медицины.

Цель исследования – изучение антимикотической активности веществ в отношении дерматофитов рода *Microsporum*.

**Материалы и методы.** Объектами исследования являлись изоляты грибов *Microsporum canis* и *Microsporum gypsum*, выделенные из шерсти лошадей и находящиеся в музеи культур микроорганизмов отделения биотехнологии Федерального центра токсикологической, радиационной и биологической безопасности. Культуры дерматофитов хранили при температуре 4 °С на агаризованной среде Сабуро [4].

Для получения препаратов (тимол, 2-меркаптобензтиазол, бензоат натрия, нафтифин, флуконазол, тербинафин, клотримазол, бензотриазол, хлорнитрофенол) вещества растворяли в органических растворителях 70 % этаноле или диметилсульфоксиде (ДМСО). Экстракт сныти и чистотела получали путем измельчения зеленой массы травы в ДМСО в соотношении 1:8 с последующим перемешиванием смеси в течение 7 суток и центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 минут. Супернатант (надосадочную жидкость) отбирали и изучали на антимикотическую активность.

Определение действия изучаемых веществ на рост культуры грибов осуществляли в концентрации 100 мкг/мл для 2-меркаптобензтиазола, тимола, бензотриазола, бензоат натрия, флуконазола, клотримазола, нафтифина, хлорнитрофенола, тербинафина и 12,5 мкг/мл для экстрактов сныти и чистотела по методике Крючковой [4]. Для этого в опытную пробирку со стерильной жидкой питательной средой Сабуро вносили тестируемые вещества или экстракты и взвесь культуры дерматофитов в количестве 200000 грибных тел/мл. Пробирки встряхивали и инкубировали при температуре 27 °С. Результаты наблюдали по наличию или отсутствию роста культуры через 14 суток совместной инкубации с изучаемыми препаратами. Параллельно ставились контрольные пробирки с культурой, которые инкубировали без внесения тестируемых веществ.

Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) тестируемых веществ определяли методом двукратных серийных разведений в диапазоне концентрации 0,098-100 мкг/мл для



2 - меркаптобензотриазола, тимол, бензотриазола, бензоат натрия, флуконазола, клотримазола, нафтифина, хлорнитрофенола, тербинафина и 0,0122-12,5 мкг/мл для экстрактов сныти и чистотела в 48-луночных стерильных планшетах в соответствии с методом, разработанным отделом микологии Всероссийской государственной центра качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ФГБУ «ВГНКИ») на основе EUCAST E.Def 9.3.1 [2]. Контролем служили лунки с культурой без тестируемого вещества. МИК (мкг/мл) выражали как минимальную концентрацию вещества, полностью ингибирующую рост культуры гриба. Чувствительность грибов к тестируемым веществам интерпретировали на основании диапазонов величин МИК [2] – более 32 мкг/мл – устойчивый, от 16 до 32 мкг/мл – дозозависимый, менее 16 мкг/мл – чувствительный.

Анализ экспериментальных результатов осуществляли методом вариационной статистики, используя программу Microsoft Office Excel 13. Достоверность разницы между исследуемыми группами определяли по t-критерию Стьюдента для независимых переменных при уровне вероятности  $p \leq 0,05$  (не менее 95 %).

**Результаты исследований.** Антимикотическую активность веществ бензоата натрия, тимол, бензотриазола, экстракта сныти и экстракта чистотела определяли в сравнении с применяемыми на практике противогрибковыми средствами хлорнитрофенолом, тербинафином, флуконазолом, нафтифином, клотримазолом, 2-меркаптобензотриазолом. В таблице 1 представлены результаты действия изучаемых веществ на рост культуры дерматофитов в концентрации 100 мкг/мл для 2-меркаптобензотриазола, клотримазола, бензоата натрия, тербинафина, бензотриазола, тимол, хлорнитрофенола, нафтифина, флуконазола и 12,5 мкг/мл для экстрактов сныти и чистотела в отношении изолятов грибов *Microsporum canis* и *Microsporum gypseum*. Тест предполагал обнаружение присутствия или отсутствия ингибирования роста культур при воздействии исследуемых веществ.

Таблица 1 – Антимикотическая активность веществ к тест-культурам

Вещество	<i>Microsporum canis</i>	<i>Microsporum gypseum</i>
Тимол	+	+
Бензоат натрия	-	-
Бензотриазол	-	-
Экстракт чистотела	+	+
Экстракт сныти	-	-
2-меркаптобензотриазол	+	+
Нафтифин	+	+
Клотримазол	+	+
Флуконазол	-	-
Хлорнитрофенол	+	+
Тербинафин	+	+
Примечания		
1 – «+» – обладает активностью.		
2 – «-» – не обладает активностью.		

Проведение скрининга исследуемых веществ на их антимикотическую активность показало, что большинство веществ обладали активностью в отношении изолятов грибов *M. canis* и *M. gypseum*. Из одиннадцати изученных нами веществ четыре не обладали антимикотической активностью к тест-культурам грибов.

В результате определения величин ингибирующих концентраций действующих веществ было установлено, что наиболее выраженной антимикотической активностью на дерматофиты *Microsporum* обладали тимол и клотримазол, для которых величины МИК составляли 6,25 мкг/мл для *M. canis* и *M. gypseum* (таблица 2). Все остальные тестируемые нами вещества были менее активными или низкоактивными.

Данные чувствительности исследуемых дерматофитов рода *Microsporum* к тестируемым веществам, которые были получены на основании диапазонов величин МИК, показали, что изоляты грибов *Microsporum canis* и *Microsporum gypseum* были чувствительны ко всем активным веществам, представленным в таблице 2, кроме экстракта чистотела в отношении изолята *M. gypseum* (таблица 2). По степени чувствительности изолятов *M. canis* и *M. gypseum* к активным веществам и их активности (МИК) исследуемые вещества можно расположить в ряд: клотримазол и тимол (МИК 6,25 мкг/мл)

> хлорнитрофенол (МИК 6,25-12,5 мкг/мл) > тербинафин (МИК 12,5 мкг/мл) > 2-меркаптобензтиазол и нафтифин (МИК 12,5-25 мкг/мл) > экстракт чистотела (МИК 25-50 мкг/мл).

Таблица 2 – Показатели МИК (минимальная ингибирующая концентрация, мкг/мл) активных веществ к тест-культурам

Активное вещество	<i>Microsporium canis</i>		<i>Microsporium gypseum</i>	
	МИК, мкг/мл	Интерпретация результатов чувствительности препарата	МИК, мкг/мл	Интерпретация результатов чувствительности препарата
Тимол	6,25	чувствительный	6,25	чувствительный
Экстракт чистотела	25	дозозависимый	50	устойчивый
2-меркаптобензтиазол	12,5	чувствительный	25	дозозависимый
Нафтифин	12,5	чувствительный	25	дозозависимый
Клотримазол	6,25	чувствительный	6,25	чувствительный
Хлорнитрофенол	6,25	чувствительный	12,5	чувствительный
Тербинафин	12,5	чувствительный	12,5	чувствительный

Результаты, полученные в экспериментах, согласуются с данными других зарубежных и отечественных авторов, где обнаружено, что дерматофиты из рода *Microsporium* чувствительны к веществам тербинафину, 2-меркаптобензтиазолу, клотримазолу, нафтифину и хлорнитрофенолу [2, 3, 6, 10, 11, 15]. Так, Хофбауэр с соавторами [10] в своих исследованиях, изучая чувствительность 275 изолятов грибов из рода *Microsporium* к известному противогрибковому препарату «Тербинафин», выявил, что большинство изолятов (99 %) обладали чувствительностью к этому антимикотическому средству. Вместе с тем информация о чувствительности дерматофитов *M. canis* и *M. gypseum* к тимолу в доступной научной литературе не обнаружена.

**Заключение.** В результате проведенных исследований показано, что вещества тимол, экстракт чистотела и известные противогрибковые соединения тербинафин, 2-меркаптобензтиазол, клотримазол, нафтифин, хлорнитрофенол способны ингибировать рост дерматофитов из рода *Microsporium*. Наиболее эффективными в отношении изолятов грибов *M. canis* и *M. gypseum* являлись тимол и клотримазол. Флуконазол, бензотриазол, бензоат натрия и экстракт сныти не обладали антимикотической активностью в отношении исследуемых дерматофитов. Тимол может стать перспективным в качестве основного действующего вещества лекарственных средств при поверхностных грибковых инфекциях.

### Литература

1. Иванов, А. И. Инфекционные болезни молодняка сельскохозяйственных животных / А. И. Иванов. – Уфа : Башкирский ГАУ, 2019. – 196 с.
2. Козлова, А. Д. Изучение резистентности патогенных и условно-патогенных грибов к противогрибковым препаратам / А. Д. Козлова, С. П. Яцентюк, В. В. Соколов // Ветеринария сегодня. – 2022. – № 11. – С. 20.
3. Косенкова, С. И. Использование нафтифина гидрохлорида и преимущества его применения для лечения различных форм грибковых инфекций / С. И. Косенкова, И. И. Краснюк, (Мл.) И. И. Краснюк // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2018. – № 13. – С. 144.
4. Крючкова, М. А. Антимикотическая активность дермадекса / М. А. Крючкова, Л. Е. Матросова, В. Ю. Титова // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2009. – № 2. – С. 150.
5. Маноян, М. Г. Бессимптомное миконительство и его значение в распространении дерматофитозов животных и человека / М. Г. Маноян, Р. С. Овчинников, А. Н. Панин // VetPharma – 2012. – № 3. – С. 40.
6. Соколова Т. В. Выбор рационального подхода к терапии микозов кожи – основа эффективности лечения / Т. В. Соколова, К. Росель // Клиническая дерматология и венерология. – 2018. – № 17. – С. 17.
7. Begum, J. Antifungal resistance in dermatophytosis: a global health concern: antifungal resistance in dermatophytes / J. Begum, P. Das // Letters in animal biology. – 2022. – Vol. 2, No 1. – P. 41.

8. Chermette, R. Dermatophytoses in animals / R. Chermette, L. Ferreira, J. Guillot // *Mycopathologia*. – 2008. – Vol. 166, No 5. – P. 385.
9. Fungal infections in animals: a patchwork of different situations / S. Seyedmousavi, S. M. Bosco, S. de Hoog [et al.] // *Journal of Medical Mycology*. – 2018. – Vol. 56 (1). – P. 165–169.
10. Hofbauer, B. In vitro susceptibility of *Microsporum canis* and other dermatophyte isolates from veterinary infections during therapy with terbinafine or griseofulvin / B. Hofbauer, I. Leitner, N. S. Ryder // *Medical Mycology* – 2002. – Vol. 40. – P. 179.
11. In-vitro activity of 10 antifungal agents against 320 dermatophyte strains using microdilution method in Tehran / P. Adimi, S. J. Hashemi, M. Mahmoudi [et al.] // *Iran. J. Pharm. Res.* – 2013. – Vol. 12. – P. 537.
12. Segal, E. Human and zoonotic dermatophytoses: epidemiological aspects / E. Segal, D. Elad // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 71.
13. State-of-the-art dermatophyte infections: epidemiology aspects, pathophysiology, and resistance mechanisms / N. M. Martinez-Rossi, T. A. Peres, T. A. Bitencourt [et al.] // *Journal of Fungi*. – 2021. – Vol. 7 (8). – P. 629.
14. Transmission of onychomycosis and dermatophytosis between household members: A Scoping Review / A. Jazdarehee, L. Malekafzali, J. Lee, R. Lewis // *Journal of Fungi*. – 2022. – Vol. 8. – P. 60.
15. Virulence and antifungal susceptibility of *Microsporum canis* strains from animals and humans / C. I. Aneke, W. Rhimi, V. Hubka [et al.] // *Antibiotics*. – 2021. – Vol. 10. – P. 296.

### References

1. Ivanov, A. I. Infectious diseases of young agricultural animals / A. I. Ivanov. – Ufa : Bashkir State Agrarian University, 2019. – 196 p.
2. Kozlova, A. D. Study of resistance of pathogenic and opportunistic fungi to antimicrobics / A. D. Kozlova, S. P. Yatsentyuk, V. V. Sokolov // *Veterinary Science Today*. – 2022. – No 11. – P. 20.
3. Kosenkova, S. I. The use of naftifini hydrochloride and its advantages in the treatment of various types of fungal diseases / S. I. Kosenkova, I. I. Krasnyuk, (Jr.) I. I. Krasnyuk // *Drug development & registration*. – 2018. – No 13. – P. 144.
4. Kryuchkova, M. A. Antimycotic activity of Dermadex / M. A. Kryuchkova, L. E. Matrosova, V. Yu. Titova // *Immunopathology, allergology, infectology*. – 2009. – No 2. – P. 150.
5. Manoyan, M. G. Asymptomatic mycocarriage and its role in the spread of dermatophytosis in animals and humans / M. G. Manoyan, R. S. Ovchinnikov, A. N. Panin // *VetPharma* – 2012. – No 3. – P. 40.
6. Sokolova T. V. The development of a rational approach to the therapy of fungal skin infections as the basis of effective treatment / T. V. Sokolova, K. Rosell // *Klinicheskaya Dermatologiya i Venerologiya*. – 2018. – No 17. – P. 17.
7. Begum, J. Antifungal resistance in dermatophytosis: a global health concern: antifungal resistance in dermatophytes / J. Begum, P. Das // *Letters in animal biology*. – 2022. – Vol. 2, No 1. – P. 41.
8. Chermette, R. Dermatophytoses in animals / R. Chermette, L. Ferreira, J. Guillot // *Mycopathologia*. – 2008. – Vol. 166, No 5. – P. 385.
9. Fungal infections in animals: a patchwork of different situations / S. Seyedmousavi, S. M. Bosco, S. de Hoog [et al.] // *Journal of Medical Mycology*. – 2018. – Vol. 56 (1). – P. 165–169.
10. Hofbauer, B. In vitro susceptibility of *Microsporum canis* and other dermatophyte isolates from veterinary infections during therapy with terbinafine or griseofulvin / B. Hofbauer, I. Leitner, N. S. Ryder // *Medical Mycology* – 2002. – Vol. 40. – P. 179.
11. In-vitro activity of 10 antifungal agents against 320 dermatophyte strains using microdilution method in Tehran / P. Adimi, S. J. Hashemi, M. Mahmoudi [et al.] // *Iran. J. Pharm. Res.* – 2013. – Vol. 12. – P. 537.
12. Segal, E. Human and zoonotic dermatophytoses: epidemiological aspects / E. Segal, D. Elad // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 71.
13. State-of-the-art dermatophyte infections: epidemiology aspects, pathophysiology, and resistance mechanisms / N. M. Martinez-Rossi, T. A. Peres, T. A. Bitencourt [et al.] // *Journal of Fungi*. – 2021. – Vol. 7 (8). – P. 629.
14. Transmission of onychomycosis and dermatophytosis between household members: A Scoping Review / A. Jazdarehee, L. Malekafzali, J. Lee, R. Lewis // *Journal of Fungi*. – 2022. – Vol. 8. – P. 60.
15. Virulence and antifungal susceptibility of *Microsporum canis* strains from animals and humans / C. I. Aneke, W. Rhimi, V. Hubka [et al.] // *Antibiotics*. – 2021. – Vol. 10. – P. 296.

Ветеринарный врач. 2023. № 2. С. 28 – 32.  
The Veterinarian. 2023; (2): 28– 32

Научная статья  
УДК 619:579:616.34:636.2  
DOI: 10.33632/1998-698X\_2023\_2\_28

### **Оценка эффективности экспериментальной композиции как лечебного средства при диарее молодняка крупного рогатого скота**

Рамзия Мухаметовна Потехина, Алексей Викторович Фролов, Екатерина Николаевна Майорова  
Дмитрий Игоревич Милованкин, Динис Анатолиевич Миргазов

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», Казань, Россия

Автор, ответственный за переписку: Алексей Викторович Фролов, frolov012@list.ru

**Аннотация.** У телят молочного периода выращивания часто встречаются расстройства работы органов пищеварения, сопровождающиеся нарушением состава микрофлоры пищеварительного тракта со сдвигом соотношения в сторону условно-патогенных видов, что приводит к диарее, снижает продуктивность животных. В связи с этим не теряет актуальности вопрос разработки новых средств борьбы с расстройствами пищеварения продуктивного скота.

Исследования проведены в трех хозяйствах Республики Мордовия, в экспериментах оценивали эффективность нового препарата (композиции, полученной на основе селимакцида и мицелиального гриба *Fusarium sambucinum* штамма ВКПМ F-139) как лечебного средства при диарее молодняка крупного рогатого скота.

Из опытных животных – телят молочного периода выращивания – в каждом из трех опытов составляли 3 группы по 10 голов: 1 группа – здоровые; 2 группа – с признаками диареи; 3 группа – с признаками диареи, подвергались лечению. Исследуемую композицию задавали внутрь в течение 14 суток в суточной дозе 700 мл/гол. На протяжении всего эксперимента учитывали клиническое состояние животных, в начале опыта и через 14 суток у животных отбирали пробы кала для определения состава микробиома пищеварительного тракта.

Результаты исследований показали, что состав микробиома телят, имеющих признаки диареи, существенно отличался от такового здоровых животных: отмечали смещение баланса в сторону условно-патогенных видов, снижение количества кишечной палочки.

Применение исследуемого препарата для лечения телят с признаками диареи приводило к нормализации микробного пейзажа пищеварительного тракта. Положительный эффект подтверждался клинической картиной.

**Ключевые слова:** телята, диарея, лечение, микрофлора, пищеварительный тракт.

### **Evaluation of the effectiveness of the experimental composition as a therapeutic agent for diarrhea of young cattle**

Ramziya M. Potekhina, Alexey V. Frolov, Ekaterina N. Mayorova, Dmitriy I. Milovankin, Dinis A. Mirgazov

Federal State Budgetary Scientific Institution «Federal Center for toxicological, radiation, and biological safety», Kazan, Russia.

Corresponding author: Alexey V. Frolov, [frolov012@list.ru](mailto:frolov012@list.ru)

**Abstract.** In calves of the dairy growing period, disorders of the digestive organs are often found, accompanied by a violation of the composition of the microflora of the digestive tract with a shift in the ratio towards conditionally pathogenic species, which leads to diarrhea, reduces the productivity of animals. In this regard, the issue of developing new means of combating digestive disorders of productive livestock does not lose relevance.

Studies were conducted in three farms of the Republic of Mordovia, the effectiveness of a new drug (a composition based on selimaccide and mycelial fungus *Fusarium sambucinum* strain VKPM F-139) was evaluated in experiments as a therapeutic agent for diarrhea of young cattle.

Of the experimental animals – calves of the dairy growing period – in each of the three experiments, 3 groups of 10 heads were made up: Group 1 – healthy; group 2 – with signs of diarrhea; group 3 – with signs of diarrhea, were treated. The studied composition was administered orally for 14 days at a daily dose of 700 ml/head. Throughout the experiment, the clinical condition of the animals was taken into account, at the beginning of the experiment and after 14 days, fecal samples were taken from the animals to determine the composition of the microbiome of the digestive tract.

The results of the studies showed that the composition of the microbiome of calves with signs of diarrhea differed significantly from that of healthy animals: there was a shift in the balance towards conditionally pathogenic species, a decrease in the number of *E. coli*.

The use of the studied drug for the treatment of calves with signs of diarrhea led to normalization of the microbial landscape of the digestive tract. The positive effect was confirmed by the clinical picture.

**Keywords:** calves, diarrhea, treatment, microflora, digestive tract.

**Введение.** При содержании крупного рогатого скота в животноводческих комплексах не всегда удается обеспечить соблюдение всех зоогигиенических норм, вследствие чего снижается резистентность организма животных, что провоцирует развитие различных заболеваний. Значительную долю среди патологий молодняка крупного рогатого скота составляют расстройства работы органов пищеварения [8, 9, 10], сопровождающиеся нарушением баланса микрофлоры толстого кишечника со сдвигом в сторону условно-патогенных видов [2, 5, 6], что замедляет темп роста и развития животных, снижает их продуктивность, нанося существенный экономический ущерб сельхозпредприятиям.

В связи с этим разработка высокоэффективных средств, способствующих быстрому восстановлению нормального микробного пейзажа [1, 3], остается актуальной задачей современной ветеринарной науки. Кроме того, характеристика микробного пейзажа является хорошим диагностическим признаком, позволяющим, вместе с клинической картиной, достоверно судить о состоянии животного и об эффективности терапии [4, 8].

Целью наших исследований стала оценка эффективности экспериментального препарата в качестве лечебного средства при диарее молодняка крупного рогатого скота.

**Материалы и методы.** В ходе исследований, проведенных в трех хозяйствах Республики Мордовия, оценивали эффективность нового препарата – композиции, полученной из селимакцида (диэтиламмониевая соль N-метиламино-1-фенилметан сульфоновой кислоты) и мицелиального гриба *Fusarium sambucinum* штамма ВКПМ F-139, как лечебного средства при диарее молодняка крупного рогатого скота [11, 12].

Животных, участвовавших в эксперименте, делили по принципу аналогов на группы, по 10 голов в каждой. Условия кормления и содержания были одинаковы для всех групп, соответствовали зоотехническим нормам.

Схема опыта представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Схема опыта

Группа опыта			Описание группы
Хоз. № 1	Хоз. № 2	Хоз. № 3	
1	4	7	Не имели признаков диареи
2	5	8	Имели признаки диареи
3	6	9	Имели признаки диареи, были подвергнуты лечению

Лечебную композицию задавали внутрь в течение 14 суток в суточной дозе 700 мл/гол. На протяжении всего эксперимента учитывали клиническое состояние животных, в начале опыта и через 14 суток у животных отбирали пробы кала для определения состава микробиома пищеварительного тракта.

Бактериологические исследования проб проводили по общепринятым методикам с применением для культивирования микроорганизмов питательных сред. Для выявления кишечной палочки использовали МПА и среду Эндо. Наличие бифидобактерий определяли посевом разведений фекалий в среду Блаурокка, их рост подтверждали микроскопически в окрашенных по Граму препаратах (полиморфные палочки, одиночно, парно располагающиеся в виде знака V). Для выделения лактобактерий использовали среду MRS, выявляя в мазках тонкие грамположительные палочки. Черные колонии с характерным металлическим блеском, выросшие на висмут-сульфитном агаре, свидетельствовали о наличии сальмонелл в исследуемых образцах. В мазках выявляли грамтрицательные палочки с типичной морфологией сальмонелл. Посевы инкубировали в термостате при температуре 37 °С. Подсчет выросших микробных колоний проводили через 24 и 48 часов культивирования. Идентификацию выделенных бактерий осуществляли, используя определитель бактерий [7].

Обработку результатов опыта проводили методом вариационной статистики с применением критерия достоверности Стьюдента.

**Результаты исследований.** Для бактериологических исследований отбирали пробы кала телят с каждой группы из трех хозяйств. В ходе работы проводили идентификацию выделенных микроорганизмов, оценивали их количество. Результаты исследований представлены на рисунках 1, 2, 3.

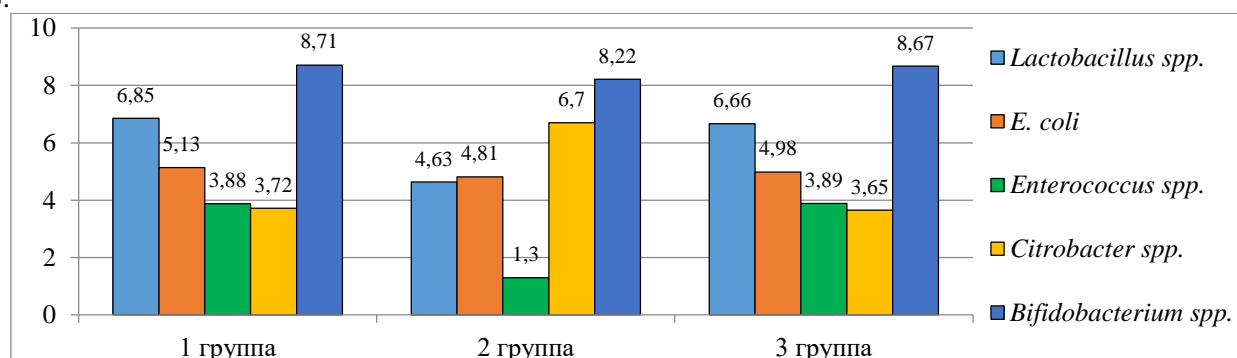


Рисунок 1 – Количество и видовая принадлежность микроорганизмов, выделенных из 1 г проб кала телят хозяйства № 1, млн. КОЕ

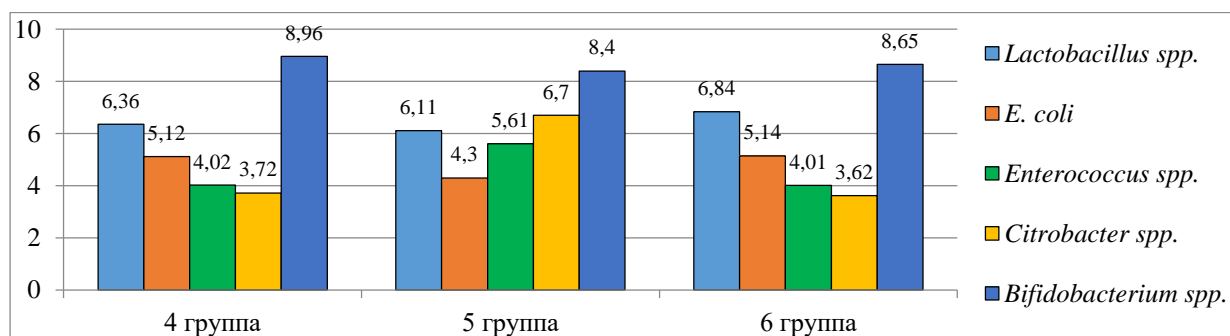


Рисунок 2 – Количество и видовая принадлежность микроорганизмов, выделенных из 1 г проб кала телят хозяйства № 2, млн. КОЕ

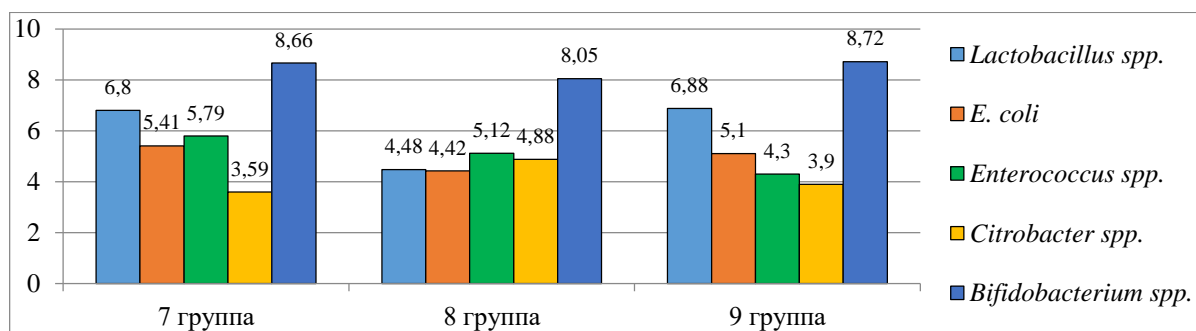


Рисунок 3 – Количество и видовая принадлежность микроорганизмов, выделенных из 1 г проб кала телят хозяйства № 3, млн. КОЕ

Как видно из диаграмм, приведенных на рисунках 1, 2, 3, состав микрофлоры пищеварительного тракта больных и здоровых телят существенно различался. В пробах кала больных животных хозяйств № 1 и № 3 отмечали значительное снижение содержания молочнокислых бактерий – на 32,4 и 34,1 % соответственно ( $p < 0,05$ ), из-за чего возрастала доля условно-патогенных бактерий – кишечной палочки, цитобактерий, а в одном случае (рисунок 3) – также энтерококков. В пробах кала больных животных хозяйства № 2 существенного снижения количества молочнокислых бактерий не отмечали, однако наблюдали значительный рост числа энтерококков и цитобактерий – на 39,5 и 80,1 % соответственно ( $p < 0,05$ ), что также смещало баланс микрофлоры в сторону условно-патогенных видов. Количество бифидобактерий во всех случаях существенно не менялось.

При применении препарата уже на 8-10 сутки опыта у телят отмечали исчезновение признаков диареи. Исследования отобранных на 14 сутки проб кала показали, что состав микробиома животных, подвергнутых лечению (группы 3, 6, 9), был близок к таковому контрольных.

У телят, подвергнутых лечению, в ходе опыта отмечали улучшение общего состояния с полным исчезновением признаков диареи на 10-13 сутки. У контрольных животных эти признаки были более выраженными, в большинстве случаев сохранялись до окончания эксперимента.

**Заключение.** Проведенные исследования позволяют заключить, что у телят молочного периода выращивания расстройства пищеварения типа диареи сопровождаются смещением баланса микрофлоры толстого кишечника в сторону условно-патогенных видов; применение экспериментального препарата в дозе 700 мл/гол. в сутки в течение 14 суток для лечения таких телят приводит к нормализации процесса пищеварения, что подтверждается восстановлением бактериального пейзажа пищеварительного тракта и клинической картиной.

### Литература

1. Андреева, А. В. Иммунный статус телят молочного периода роста при комбинированном применении пробиотиков и пребиотиков // А. В. Андреева, З. З. Ильясова, О. М. Алтынбеков, А. З. Хакимова // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2021. – Т. 249 (1). – С. 10–14.
2. Галиева, З. А. Эффективный метод лечения диареи молодняка крупного рогатого скота / З. А. Галиева, З. З. Ильясова, И. Р. Газеев, С. Р. Зиянгирова // Известия оренбургского государственного аграрного университета. – 2018. – № 1 (69). – С. 131–134.
3. Гаффаров, Х. З. Моно- и смешанные инфекционные диареи новорожденных телят и поросят / Х. З. Гаффаров, А. В. Иванов, Е. А. Непоклонов, А. З. Равилов. – Казань : Изд-во «Фэн», 2002. – 592 с.
4. Красникова, Е. С. Эффективность применения лекарственной композиции на основе АСД-2 фракции для коррекции диспепсических проявлений у телят / Е. С. Красникова, Р. В. Радионов, А. В. Красников // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2021. – Т. 247 (3). – С. 97–101.
5. Макаев, Х. Н. Методические рекомендации по применению селимакцида при желудочно-кишечных заболеваниях животных / Х. Н. Макаев, А. И. Никитин, Г. Х. Муртазина, К. Х. Папуниди, Г. Н. Спиридонов, Р. М. Потехина, Р. Н. Аглямов, В. И. Дорожкин. – Казань : Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, 2016. – 28 с.
6. Мурленков, Н. В. Интенсивность роста молодняка крупного рогатого скота при включении про- и пребиотических препаратов / Н. В. Мурленков // Вестник КрасГАУ. – 2019. – № 2 (143). – С. 199–205.
7. Определитель бактерий Берджи: в 2-х т. / Под редакцией Дж. Хоулта, Н. Крига и др. пер. с англ. Москва : Мир, 1997. – 482 с.
8. Потехина, Р. М. Антимикробная активность, токсикологические параметры и возможные отдаленные последствия селимакцида / Р. М. Потехина, Х. Н. Макаев, Г. Х. Муртазина // Ветеринарный врач. – 2009. – № 5. – С. 6–9.
9. Сидоров, М. А. Основы профилактики желудочно-кишечных заболеваний новорожденных животных. / М. А. Сидоров, В. В. Субботин // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2008. – № 3. – С. 8–12.
10. Фролов, А. В. Молочная продуктивность, качество и химический состав молока коров при использовании в рационах кормовых добавок «Лакто-Гарант, СП-60 и «Сел-Плекс» / А. В. Фролов, Р. Р. Гайнуллин, К. Н. Вагин, К. Т. Ишмухаметов, Е. Н. Майорова // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2021. – Т. 244 (4). – С. 207–212.

11. Патент № 2769617 С1. Российская Федерация, МПК А61К 31/85, А61К 36/062, А61Р 1/00. Лекарственная композиция и способ для профилактики диареи у новорожденных телят : № 2021115647 : заявл. 31.05.2021 : опубл. 04.04.2022 / Низамов Р. Н., Потехина Р. М., Титова В. Ю., Трemasова А.М., Фицев И. М., Калимуллин Ф. Х., Нefедова Р. В., Фролов А. В., Вафин Ф. Р. – 12 с.

12. Патент № 2772917 С1. Российская Федерация, МПК А23К. Натуральная биологически активная кормовая добавка : № 2021120797 : заявл. 13.07.2021 : опубл. 27.05.2022 / Низамов Р. Н., Насыбуллина Ж. Р., Потехина Р. М., Титова В. Ю., Трemasова А.М., Фицев И. М., Калимуллин Ф. Х., Нefедова Р. В., Фролов А. В., Вафин Ф. Р. – 21 с.

## References

1. Andreeva, A.V. The immune status of calves of the dairy growth period with the combined use of probiotics and prebiotics // A.V. Andreeva, Z. Z. Piyasova, O. M. Altynbekov, A. Z. Khakimova // Scientific notes of the Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman. – 2021. – Т. 249 (1). – P. 10-14.

2. Galieva, Z. A. An effective method of treating diarrhea of young cattle / Z. A. Galieva, Z. Z. Piyasova, I. R. Gazeev, S. R. Ziyangirova // Proceedings of the Orenburg State Agrarian University. – 2018. – № 1 (69). – P. 131-134.

3. Gaffarov, H. Z. Mono- and mixed infectious diarrhea of newborn calves and piglets / H. Z. Gaffarov, A.V. Ivanov, E. A. Nepoklonov, A. Z. Ravirov. – Kazan : Publishing house "Feng", 2002/ - 592 p.

4. Krasnikova, E. S. The effectiveness of the use of a medicinal composition based on ASD-2 fraction for the correction of dyspeptic manifestations in calves / E. S. Krasnikova, R. V. Radionov, A.V. Krasnikov // Scientific notes of the Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman. – 2021. – Vol. 247 (3). – P. 97-101.

5. Makaev, H. N. Methodological recommendations for the use of selimaccide in gastrointestinal diseases of animals / H. N. Makaev, A. I. Nikitin, G. H. Murtazina, K. H. Papunidi, G. N. Spiridonov, R. M. Potekhina, R. N. Aglyamov, V. I. Dorozhkin. – Kazan : Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, 2016. – 28 p.

6. Murlenkov, N. V. The intensity of growth of young cattle with the inclusion of pro- and prebiotic drugs / N. V. Murlenkov // Bulletin of KrasGAU. – 2019. – № 2 (143). – P. 199-205.

7. The determinant of bacteria Bergi: in 2 volumes / Edited by J. Hoult, N. Krieg et al. trans. from English Moscow : Mir, 1997. – 482 p.

8. Potekhina, R. M. Antimicrobial activity, toxicological parameters and possible long-term consequences of selimaccide / R. M. Potekhina, H. N. Makaev, G. H. Murtazina // Veterinarian. – 2009. – № 5. – P. 6-9.

9. Sidorov, M. A. Fundamentals of prevention of gastrointestinal diseases of newborn animals. / M. A. Sidorov, V. V. Subbotin // Veterinary medicine of farm animals. - 2008. – № 3. – P. 8–12.

10. Frolov, A.V. Dairy productivity, quality and chemical composition of cow's milk when used in the diets of feed additives "Lacto-Garant, SP-60 and Sel-Plex" / A.V. Frolov, R. R. Gainullin, K. N. Vagin, K. T. Ishmukhametov, E. N. Mayorova // Scientists notes of the Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman. – 2021. – Vol. 244 (4). – P. 207-212.

11. Patent No. 2769617 C1. Russian Federation, IPC A61K 31/85, A61K 36/062, A61R 1/00. Medicinal composition and method for the prevention of diarrhea in newborn calves : No. 2021115647 : application 31.05.2021 : publ. 04.04.2022 / Nizamov R. N., Potekhina R. M., Titova V. Yu., Tremasova A.M., Fitsev I. M., Kalimullin F. H., Nefedova R. V., Frolov A.V., Vafin F. R. – 12 S.

12. Patent No. 2772917 C1. Russian Federation, IPC A23K. Natural biologically active feed additive : No. 2021120797 : application 13.07.2021 : publ. 27.05.2022 / Nizamov R. N., Nasybullina Zh. R., Potekhina R. M., Titova V. Yu., Tremasova A.M., Fitsev I. M., Kalimullin F. H., Nefedova R. V., Frolov A.V., Vafin F. R. – 21 p.



Ветеринарный врач. 2023. № 2. С. 33 – 40.  
The Veterinarian. 2023; (2): 33– 40

Научная статья  
УДК 636.2.082.453  
DOI: 10.33632/1998-698X\_2023\_2\_33

### **Иммунная защита телят в зависимости от качества молозива**

Владимир Григорьевич Семенов, Елена Павловна Симурзина, Дмитрий Анатольевич Никитин, Роман Сергеевич Караулов, Геннадий Викторович Захаровский, Анна Вячеславовна Лузова

Чувашский государственный аграрный университет, Чебоксары, Россия.

Автор, ответственный за переписку: Владимир Григорьевич Семенов, semenov\_v.g@list.ru

**Аннотация.** Целью настоящей работы явилась оценка влияния иммуностимулирующих препаратов Salus-P-E и Bovistim-K на качество молозива и иммунный статус телят после выпойки молозива. Научно-исследовательская работа проведена на коровах-первотелках голштинской породы. Было подобрано три группы глубокостельных коров по принципу групп-аналогов по 10 животных в каждой. Коровам 1-ой опытной группы внутримышечно в среднюю треть шеи инъецировали Salus-P-E в дозе 10 мл трехкратно за 60, 30 и 15 суток до предполагаемой даты отела, 2-ой опытной группы – Bovistim-K в те же сроки и дозе, в контрольной группе биопрепараты не использовали. Отбор проб молозива проводили двукратно: в течение 60 минут после отела и через 24 часа после отела. Во второй серии опыта изучали клинико-физиологическое состояние и показатели крови новорожденных телят после выпойки молозива. Молозиво коров 1-й и 2-й опытных групп содержало больше иммуноглобулинов, чем контрольные пробы на 23,8 и 27,67 г/л; общего белка – на 3,08 и 3,32 %; уровень казеинов – на 0,34 и 0,22 % соответственно. На фоне иммунокоррекции организма глубокостельных коров-матерей происходит увеличение количества гемоглобина, общего белка, резервной щелочности и определенные изменения соотношения белковых фракций крови новорожденных телят. В первые сутки жизни установлено повышение в сыворотке крови телят 1 и 2 опытных групп по сравнению с контролем: альбуминов на 7,9 и 8,4 %;  $\alpha$ -глобулинов – на 18,6 и 15,7 %,  $\beta$ -глобулинов – на 22,1 и 16,9 %,  $\gamma$ -глобулинов на 24,4 и 21,4 % соответственно. Выпойка качественного молозива (показатель Брикс выше 24) способствовала повышению среднесуточных приростов у телят 1-й и 2-й опытных групп на 18,2 и 20,2 %. Применение иммуностимулирующих препаратов Salus-P-E и Bovistim-K повышает иммунокомпетентные свойства молозива, что способствует формированию в организме новорожденных телят высокого уровня колострального иммунитета, снижая заболеваемость и улучшая показатели роста и сохранности.

**Ключевые слова:** коровы, молозиво, иммуноглобулины, телята, Salus-P-E и Bovistim-K.

### **Immune protection of calves depending on the quality of colostrum**

Vladimir G. Semenov, Elena P. Simurzina, Dmitry A. Nikitin, Roman S. Karaulov, Gennady V. Zakharovsky, Anna V. Luzova,

Chuvash State Agrarian University, Cheboksary, Russia

Corresponding author: Vladimir Grigoryevich Semenov, semenov\_v.g@list.ru

**Abstract.** The aim of this work was to evaluate the effect of immunostimulating drugs Salus-P-E and Bovistim-K on the quality of colostrum and the immune status of calves after drinking colostrum. Research work was carried out on first-calf heifers of the Holstein breed. Three groups of deep-calving cows were selected according to the principle of analogue groups of 10 animals each. Cows of the 1st experimental group were injected intramuscularly in the middle third of the neck with Salus-P-E at a dose of 10 ml three times 60, 30 and 15 days before the expected date of calving, the 2nd experimental group - Bovistim-K at the same time and dose, in the control group, biological preparations were not used. Colostrum sampling was carried out twice: within 60 minutes after calving and 24 hours after calving. In the second series of experiments, we studied the clinical and physiological state and blood parameters of newborn calves after drinking colostrum. The colostrum of cows of the 1st and 2nd experimental groups contained more immunoglobulins than control samples by 23.8 and 27.67 g/l; total protein - by 3.08 and 3.32%; the level of caseins - by 0.34 and 0.22%,

respectively. Against the background of immunocorrection of the organism of deep-calving mother cows, there is an increase in the amount of hemoglobin, total protein, reserve alkalinity and certain changes in the ratio of protein fractions of blood of newborn calves. In the first day of life, an increase in the blood serum of calves of the 1st and 2nd experimental groups was found compared to the control: albumin by 7.9 and 8.4%;  $\alpha$ -globulins - by 18.6 and 15.7%,  $\beta$ -globulins - by 22.1 and 16.9%,  $\gamma$ -globulins by 24.4 and 21.4%, respectively. Drinking high-quality colostrum (Brix over 24) contributed to an increase in average daily gains in calves of the 1st and 2nd experimental groups by 18.2 and 20.2%. The use of immunostimulating drugs Salus-P-E and Bovistim-K increases the immunocompetent properties of colostrum, which contributes to the formation of a high level of colostrum immunity in the body of newborn calves, reducing morbidity and improving growth and survival rates.

**Keywords:** cows, colostrum, immunoglobulins, calves, Salus-P-E, Bovistim-K.

**Введение.** Эффективная система выращивания ремонтных телок имеет решающее значение для устойчивости и экономики молочных ферм. Неонатальные заболевания, такие как диарея и пневмония, влияют на экономические показатели из-за затрат, связанных с потерей телят, лечением и дальнейшим негативным воздействием на воспроизводительные функции телок [3, 8].

Согласно литературным данным заболевания желудочно-кишечного тракта поражают от 25 до 55 % новорожденных телят, а болезни органов дыхания 14–25 % [1, 8].

В связи с тем, что иммунная система новорожденных телят несформированная, единственным действенным средством защиты от заболеваний является пассивная передача иммуноглобулинов при выпойке молозива [5, 9].

Доказано, что потребление качественного молозива в течение первых часов жизни оказывает влияние на реализацию биоресурсного потенциала телят в дальнейшем, а именно повышает усвояемость питательных веществ кормов, снижает возраст первотелок и улучшает надой молока в первую лактацию [2, 10]. Молозиво является основным источником защитных иммуноглобулинов, лизоцима, функционально активных лейкоцитов и лимфоцитов. В первые шесть часов жизни стенки кишечника обладают наилучшей проходимостью для антител. После этого проходимость кишечника резко снижается, а через сутки и вовсе прекращается. Теленок, получивший 200 г Ig, считается оптимально обеспеченным. Уровень IgG = 50 г/л соответствует рекомендуемым 4 литрам молозива, а если же ниже, то объем выпойки молозива должен быть больше.

Однако, существует множество факторов, определяющих качество молозива. Многочисленные исследования доказывают влияние количества лактаций на IgG в молозиве. Коровы старше трех лактаций производят больше IgG из-за длительного контакта с специфическими для ферм микроорганизмами [4, 6]. Существует понятие «эффект разбавления», который приводит к значительному снижению иммуноглобулинов за счет увеличения объема молозива. Данное явление наблюдается при увеличении времени от отела до первого доения. Количество молозива при первом доении также оказывает влияние на уровень иммунокомпетентных клеток в его составе. Происходит снижение IgG на 1,7 г/л, когда количество молозива увеличилось на 1 кг [7].

**Цель настоящей работы** – оценка влияния иммуностимулирующих препаратов Salus-P-E и Bovistim-K на качество молозива и иммунный статус телят после выпойки молозива.

В соответствии с поставленной целью были определены следующие задачи:

- 1) исследовать физико-химические свойства молозива коров на фоне применения препаратов;
- 2) изучить морфологические и иммунобиохимические показатели крови новорожденных телят после выпойки молозива;
- 3) определить влияние качества молозива на динамику роста и среднесуточные приросты телят;
- 4) проанализировать заболеваемость и сохранность телят после выпойки молозива различного по качеству и полноценности.

**Материал и методы исследования.** Научно-производственный эксперимент проведен на базе животноводческого комплекса Чувашской Республики, а обработка полученных данных произведена на базе лабораторий Чувашского государственного аграрного университета. Первая серия опытов заключалась в определении количественных и качественных показателей молозива от коров на фоне иммунокоррекции отечественными биопрепаратами. Объектами исследований стали первотелки голштинской породы, по 10 голов в каждой группе. Было подобрано 3 группы животных с учетом их клинико-физиологического состояния, возраста и живой массы.

Коровам 1-ой опытной группы внутримышечно в среднюю треть шеи инъецировали Salus-P-E в дозе 10 мл трехкратно за 60, 30 и 15 суток до предполагаемой даты отела, 2-ой опытной группы –

Vovistim-K в те же сроки и дозе, в контрольной группе биопрепараты не использовали. Отбор проб молозива проводили двукратно: в течение 60 минут после отела и через 24 часа после отела.

Во второй серии исследований изучали заболеваемость, сохранность, морфологические, биохимические и иммунобиологические показатели крови новорожденных телят после выпойки молозива. Новорожденные телята делились на группы в соответствии с коровами-матерями.

Телят после рождения позволяли вылизывать коровам-матерям и после этого изолировали в индивидуальные боксы под лампы для сушки. В течение 30 минут после рождения проводили взвешивание телят и выпаивали 4 л материнского молозива с помощью зонда. Пробы крови были отобраны у телят в 1-е, 3-и и 7-е сутки жизни.

Исследования проведены с использованием следующих методик:

- зоотехнических – определяли живую массу и среднесуточный прирост животных ежемесячным взвешиванием на электронных весах, модель ВСП4-1000.2 Ж;

- ветеринарных – общий анализ крови (эритроциты, гемоглобин, лейкоциты) проводили на автоматическом гематологическом анализаторе PCE 90 Vet;

- биохимических – уровень общего белка и его фракции, глюкозы, кальция, щелочного резерва измеряли автоматическим биохимическим и иммуноферментным анализатором «Chem Well Combo»;

- иммунологических – плотность молозива и показатель Брикс определяли рефрактометром MISCO модель RA202. Уровень иммуноглобулинов в крови по классам определяли при помощи анализатора StatFax 303+;

- ветеринарно-санитарных – содержание жира, белка, сухого вещества, плотность, лактозу определяли автоматизированным измерительным прибором «Лактан 700»; содержание кальция в молозиве и молоке – титриметрическим методом ГОСТ 12081- 2013; казеин – рефрактометрическим методом на рефрактометре ИРФ-464; количественное содержание белковых фракций методом денситометрирования полученных фореграмм на микрофотометре ИФО-451.

Цифровые данные исследований были обработаны методом вариационной статистики на достоверность различия сравниваемых показателей ( $P < 0,05-0,001$ ) с использованием программного комплекса Microsoft Office Excel 2007.

**Результаты и обсуждение.** В таблице 1 приведены результаты исследований молозива на фоне иммунокоррекции организма коров-матерей.

Показатель Брикс свыше 24 отмечается у молозива отличного качества, которое содержит более 50 г/л IgG. Телятам в первые часы жизни необходимо получить 150-200 г/л IgG, следовательно, нужно выпойть не менее 4 литров молозива для формирования колострального иммунитета. Наибольший показатель Брикс установлен во 2-й опытной группе на фоне применения Vovistim-K – 30,3 %, показатель получен при отборе молозива в первый час после отела. Спустя сутки отмечено снижение данного показателя во всех группах на 3,8% 2,9 и 2,6 % соответственно.

Результаты анализа проб молозива свидетельствуют о благоприятном влиянии разработанных биопрепаратов на физико-химические характеристики молозива. Молозиво коров 1 и 2 опытных групп содержит больше питательных веществ и иммуноглобулинов по сравнению с контролем. Плотность молозива, отобранного в течение первого часа после отела, в опытных образцах составила  $1,065 \pm 0,14$  г/см<sup>3</sup> (контрольная группа),  $1,074 \pm 0,10$  г/см<sup>3</sup> (1-я опытная группа) и  $1,073 \pm 0,19$  г/см<sup>3</sup> (2-я опытная группа). Молозиво коров 1-й и 2-й опытных групп содержало больше иммуноглобулинов, чем контрольные пробы на 23,8 и 27,67 г/л. Спустя 24 часа после отела в пробах молозива отмечается значительное снижение количества Ig (в 2 раза) и, как следствие, происходит уменьшение плотности. При этом изучаемые показатели оставались выше в 1 и 2 опытных группах, нежели в контроле.

Содержание общего белка в молозиве животных 1-й опытной группы было выше, чем в контрольной на 3,08 %, 2-й – на 3,32 %.

Плотность молозива менее 1,040 г/см<sup>3</sup> свидетельствует о низком содержании иммуноглобулинов и не пригодно для выпойки телятам. При плотности 1,041-1,050 г/см<sup>3</sup> в молозиве содержится 45-54 % Ig, что считается средним качеством. При плотности 1,051-1,060 г/см<sup>3</sup> уровень Ig=55-60 %, самым качественным молозивом считается молозиво с плотностью 1,061-1,080 г/см<sup>3</sup>, которое содержит 66-80 % защитных белков.

В динамике лактозы достоверных различий не выявлено.

Таблица 1 – Физико-химическая характеристика молозива

Показатель	Группа животных					
	Контрольная		Salus-P-E		Bovistim-K	
	1 час после отела	24 часа после отела	1 час после отела	24 часа после отела	1 час после отела	24 часа после отела
Количество молозива, л	7	7	7	7	7	7
Показатель Брикс, %	24,4	20,6	29,4	26,5	30,3	27,7
Плотность молозива, г/см <sup>3</sup>	1,065±0,14	1,052±0,12	1,074±0,10*	1,063±0,13*	1,073±0,19*	1,064±0,11*
Кислотность, pH	6,32	6,27	6,31	6,24	6,32	6,26
Сухое вещество, %	22,4±0,74*	17,6±0,48**	23,9±0,92**	21,5±0,88**	23,7±0,85**	20,5±0,67*
Вола, %	0,95±0,07	0,89±0,01	1,08±0,05	0,96±0,06	1,10±0,03	0,95±0,12
Общий белок, %	13,28±0,16***	7,13±0,12	16,36±0,11***	9,68±0,09*	16,60±0,10**	8,45±0,18*
Казеин, %	3,78±0,09*	3,23±0,06	4,12±0,07*	4,00±0,05*	4,2±0,05*	3,94±0,08*
Альбумины, %	0,9±0,06	0,9±0,02	1,3±0,03	1,17±0,08	1,25±0,05*	1,11±0,12
Иммуноглобулины, г/л	88,72±0,48	41,33±0,32	112,56±0,44	54,10±0,57	116,39±0,53	56,56±0,27
Ig G	62,50±0,58	32,15±0,47	76,66±0,57**	38,36±0,18	76,79±0,64**	37,24±0,29*
Жир, %	5,23±0,08	4,17±0,06	5,68±0,08*	4,85±0,11	5,4±0,19*	4,72±0,10
Лактоза, %	2,3±0,03	2,8±0,06	2,3±0,02	2,7±0,11	2,4±0,06	2,6±0,11
Са, %	0,25	0,16	0,31	0,23	0,33*	0,24

\* P<0,05, \*\* P<0,01, \*\*\* P<0,001.

Основными фракциями белков молозива являются казеины, альбумины и глобулины. Казеины выполняют энергетическую и питательную функции организма новорожденного, альбумины обеспечивают рост и развитие, а глобулины – защиту от воздействия патогенной микрофлоры.

Уровень казеиновой фракции белка молозива у животных 1-й и 2-й опытных групп был выше, чем в контрольной на 0,34 и 0,22 % соответственно. В молозиве коров опытных групп (в первой партии) отмечено достоверное увеличение альбуминов на 0,4 % – 1-ая опытная и 0,35 % – 2-ая опытная, нежели в контроле.

Из иммуноглобулинов у коров в молозиве содержится в основном IgG, который проникает из сыворотки крови через альвеолярный эпителий молочной железы в последние дни 3-го триместра стельности и достигает максимальных значений в первые 3-4 дня после отела.

В ходе анализа морфологического состава крови телят подопытных групп существенных различий не установлено (Таблица 2). Однако достоверная разница отмечена в концентрации гемоглобина. Телята опытных групп превосходили контрольных сверстников по данному показателю в течение всего опыта, в первые сутки жизни – на 1,9 – 6,7 %, на 7-е сутки – на 8,5 – 9,8 %.

Таблица 2 – Морфологические и иммунобиохимические показатели крови новорожденных телят

Показатель	Период наблюдения		
	1 сутки жизни	3 сутки жизни	7 сутки жизни
Контрольная группа			
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	7,64±0,13	7,88±0,24	7,92±0,19
Гемоглобин, г/л	108,5±1,34	110,2±1,18	111,4±1,49**
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	8,12±0,27	9,06±0,15	9,62±0,75
Общий белок, %	62,1±0,67	62,8±0,43	63,0±0,33
Альбумины, г/л	20,3±2,8	21,4±3,1	22,0±1,8
$\alpha$ -глобулины, г/л	10,2±0,6	10,8±0,3	12,5±0,3
$\beta$ -глобулины, г/л	7,7±0,8	8,2±1,7	8,9±1,7
$\gamma$ -глобулины, г/л	13,1±1,2*	13,8±1,0	14,7±1,0

Ig G+A	11,05±0,55	13,16±0,57	12,95 ± 0,03
Ig M	1,46 ± 0,13	1,79 ± 0,11	1,38 ± 0,03
Глюкоза, ммоль/л	2,71 ± 0,03	2,78 ± 0,03	2,92 ± 0,06
Щелочной резерв, об%CO <sup>2</sup>	48,2±1,05	49,4±0,96	51,6±0,53**
Общий кальций, ммоль/л	2,16±0,07	2,22±0,08	2,32±0,08
1-ая опытная группа, Salus-P-E			
Эритроциты, x10 <sup>12</sup> /л	7,85±0,1	8,29±0,24	8,84±0,32
Гемоглобин, г/л	115,8±1,95	119,5±1,34**	122,3±1,08
Лейкоциты, x10 <sup>9</sup> /л	8,01±0,45	8,33±0,32	8,16±0,13
Общий белок, %	65,6±0,78*	66,8±0,44*	67,4±0,67
Альбумины, г/л	21,9±1,5	23,0±2,2	24,1±3,3**
α-глобулины, г/л	12,1±0,9	13,0±1,5	13,4±0,9
β-глобулины, г/л	9,4 ± 1,0	10,1±0,7	11,2±1,0
γ-глобулины, г/л	16,3±1,1	16,9±1,2	17,8±1,5
Ig G+A	14,48±0,64	16,64±0,39*	15,75±0,31
Ig M	1,58±0,64	1,72±0,28	1,65±0,33
Глюкоза, ммоль/л	2,86 ± 0,05	3,03 ± 0,04	3,11 ± 0,04*
Щелочной резерв, об%CO <sup>2</sup>	49,6±1,05	50,7±0,84*	52,2±0,79**
Общий кальций, ммоль/л	2,48±0,09*	2,65±0,10	2,72±0,16
2-ая опытная группа, Bovistim-K			
Эритроциты, x10 <sup>12</sup> /л	8,05±0,17	8,36±0,28	8,70±0,14
Гемоглобин, г/л	110,6±1,57*	117,0±2,05	120,9±1,64*
Лейкоциты, x10 <sup>9</sup> /л	7,89±0,55	8,11±0,13	8,00±0,44
Общий белок, %	63,8±0,52	65,6±0,36*	67,0±0,89
Альбумины, г/л	22,0±1,8	23,0 ± 2,8	23,8±1,7
α-глобулины, г/л	11,8±1,6	12,5±1,4	13,1±0,3
β-глобулины, г/л	9,0 ± 0,8	9,3±0,6	9,7 ± 0,6
γ-глобулины, г/л	15,9±1,3	16,4±0,8	17,0±1,2
Ig G+A	14,15±0,26	16,06±0,31*	15,42±0,48*
Ig M	1,50±0,17	1,66±0,63	1,54±0,38
Глюкоза, ммоль/л	2,90 ± 0,09	3,00 ± 0,09	3,09 ± 0,08*
Щелочной резерв, об%CO <sup>2</sup>	49,8±1,055*	51,1±0,96	52,2±1,16**
Общий кальций, ммоль/л	2,43±0,15	2,60±0,22*	2,71±0,17

\* P<0,05, \*\* P<0,01, \*\*\* P<0,001.

Результаты биохимических исследований крови показали, что с возрастом у телят происходят нарастание количества общего белка, резервной щелочности и определенные изменения соотношения белковых фракций.

При оценке иммунного статуса телят в первые сутки жизни мы установили повышение в сыворотке крови животных 1 и 2 опытных групп по сравнению с контрольной: альбуминов на 7,9 и 8,4 %; α-глобулинов – на 18,6 и 15,7 %, β-глобулинов – на 22,1 и 16,9 %, γ-глобулинов на 24,4 и 21,4 % соответственно. Следовательно, инъекцированные стельным коровам препараты Salus-P-E и Bovistim-K способствуют повышению уровня колострального иммунитета у полученных от них телят.

Высокий уровень глюкозы у новорожденных телят служит основным источником энергии в процессе развития жвачных животных и должен оставаться таковым до тех пор, пока рубец полностью не начнет функционировать [10]. В первые сутки жизни у телят, получавших молозиво от коров после применения биопрепаратов, отмечается достоверное превосходство по уровню глюкозы – на 5,5 – 7,0 %, на 7 сутки жизни – на 5,8 – 6,5 %, по сравнению с контролем.

Динамика изменения живой массы и среднесуточных привесов молодняка на фоне применения биопрепаратов представлена на рисунках 1 и 2.

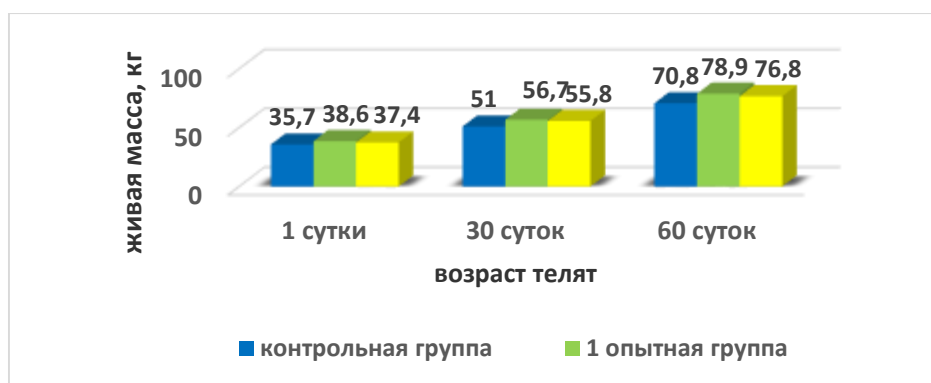


Рисунок 1 – Динамика роста телят

Средняя живая масса телят голштинской породы при рождении составила 35,7 кг в контрольной группе, 38,6 кг – в 1-ой опытной, 37,4 кг – во 2-ой опытной. Таким образом, опытные телята превосходили контрольных сверстниц по данному показателю на 8,1 и 4,8 % соответственно.



Рисунок 2 – Среднесуточный прирост телят

В 30-суточном возрасте живая масса телят, матерям которых инъецировали препарат Salus-P-E составила  $56,7 \pm 0,93$  кг, а среднесуточный прирост –  $603 \pm 10,59$  г. Телята второй опытной группы достигли в месячном возрасте  $55,8 \pm 1,30$  кг, динамика их роста была несколько выше и составила  $613 \pm 14,86$  г. В двухмесячном возрасте живая масса телят 1-й опытной группы составила  $78,9 \pm 1,45$  кг при среднесуточном приросте  $740 \pm 14,54$  г, а 2-й опытной –  $76,8 \pm 1,39$  кг и  $700 \pm 11,35$  г, что также было достоверно выше чем у контрольных животных. Живая масса телят на втором месяце жизни в 1-й и 2-й опытных группах превосходила контрольные значения на 11,4 и 8,5% соответственно.

В таблице 3 приведены данные по заболеваемости подопытных телят.

Таблица 3 – Заболеваемость и сохранность телят

Показатель	Группа животных					
	Контрольная		1 опытная Salus-P-E		2 опытная Bovistim-K	
	n	%	n	%	n	%
Количество телят в начале исследования, голов	8	100	8	100	8	100
Случаи заболевания, голов	5	62,5	2	25,0	2	25,0
В том числе:						
гастроэнтериты, диспепсии	4	50,0	2	25,0	2	25,0
бронхиты, бронхопневмонии	1	12,5	-	-	-	-
Падеж, гол.	1	12,5	-	-	-	-
Количество телят в конце исследования, голов	7	87,5	8	100	8	100
Сохранность, %	87,5		100		100	

Превосходство животных опытных групп по показателям интенсивности роста обусловлено высокой заболеваемостью контрольных телят. За весь период наблюдения зарегистрировано 9 случаев заболевания (5 из них в контрольной группе). В большей степени распространены болезни желудочно-кишечного тракта. Заболевания телят возникали преимущественно в первый месяц жизни. В контрольной группе пал один теленок с токсической формой диспепсии. В опытных группах сохранность составила 100 %, в контрольной – 87,5 %. Ссылаясь на полученные результаты, можно заключить, что применение иммуностимулирующих препаратов Salus-P-E и Bovistim-K повышает иммунокомпетентные свойства молозива, что способствует формированию в организме новорожденных телят высокого уровня колострального иммунитета. Данный фактор определял частоту и тяжесть течения желудочно-кишечных и респираторных заболеваний.

**Выводы.** На фоне применения биопрепаратов нами установлено достоверное увеличение СВ молозива – на 1,5 и 1,3 %; общего белка молозива – на 3,08 и 3,32 %; иммуноглобулинов – на 26,9 и 31,2 %; кальция – на 0,06 и 0,08 %; жира – на 0,45 и 0,17 %.

В первые сутки жизни телят установлено повышение в сыворотке крови 1 и 2 опытных групп по сравнению с контролем: альбуминов на 7,9 и 8,4 %;  $\alpha$ -глобулинов – на 18,6 и 15,7 %,  $\beta$ -глобулинов – на 22,1 и 16,9 %,  $\gamma$ -глобулинов на 24,4 и 21,4 % соответственно.

Выпойка качественного молозива (показатель Брикс выше 24) способствовало повышению среднесуточных приростов у телят 1-й и 2-й опытных групп на 18,2 и 20,2 %. Телята 1-й и 2-й опытных групп превосходили по живой массе на втором месяце жизни контрольных сверстниц на 11,4 и 8,5% соответственно. В контрольной группе заболеваемость телят составила 62,5 %, в 1-й и 2-й опытных – 25,0 %, а сохранность – 87,5 % в контроле и 100 % в опытных группах.

Таким образом, биопрепараты Salus-P-E и Bovistim-K дают возможность вырастить здоровых ремонтных телок за счёт повышения пассивного колострального иммунитета и снижения заболеваемости в ранний постнатальный период. Высокая эффективность разработанных и апробированных препаратов основана на свойствах их компонентов активизировать обменные процессы в организме через гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему и способности подавлять жизнедеятельность болезнетворных агентов.

### Литература

1. Белко А.А., Дремач Г.Э., Мацинович М.С. Структура заболеваемости животных незаразными болезнями // Ветеринарный журнал Беларуси. Минск, 2022. № 1(16). С. 3-6.
2. Семенов В.Г., Симурзина Е.П. Способ повышения молочной продуктивности и качества молока коров // Мат. междунар. науч.-практ. конф., посвященной 90-летию со дня рождения А.И. Кузнецова. Чебоксары, 2020. С. 142-148.
3. Симурзина Е.П. Заболеваемость и сохранность, продуктивные и воспроизводительные качества импортного голштинского скота // Молодежь и инновации: мат. XV всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых, аспирантов и студентов. Чебоксары, 2019. С. 198-203.
4. Chuck G.M., Mansell P.D., Stevenson M.A. Factors affecting colostrum quality in Australian pasture-based dairy herds // Australian veterinary journal // 2017. 95(11). P. 421-426.
5. Godden, S. Colostrum management for dairy calves // Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 2008. Т. 24. №. 1. P. 19-39.
6. Phipps A. J., Beggs D. S., Murray A. J., Mansell P. D., Pyman M.F., Factors associated with colostrum immunoglobulin G concentration in Northern-Victorian dairy cows. Australian veterinary journal. 2017. 95(7). P. 237-243.
7. Reschke C., Schelling E., Michel A., Remy-Wohlfender F., Meylan M. Factors associated with colostrum quality and effects on serum gamma globulin concentrations of calves in Swiss dairy herds. Journal of veterinary internal medicine. 2017. 31(5). P. 1563-1571.
8. Semenov V., Mudarisov R., Larionov G. Prevention of transport stress in imported heifers improves their health status and their productive parameters // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science: International AgroScience Conference, Cheboksary, 2020. P. 012025. – DOI 10.1088/1755-1315/433/1/012025.
9. Semenov V., Maykotov A., Kondruchina S. Veterinary and hygienic methods of directed reproduction in formation of healthy herds of cows // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Cheboksary. 2021. P. 012-021. DOI 10.1088/1755-1315/935/1/012021.
10. Soberon F., Raffrenato, E., Everett, R.W., Van Amburgh, Prewaning milk replacer intake and effects on long-term productivity of dairy calves // Journal of Dairy Science. 2012. Т. 95. №. 2. P. 783-793.

**References**

1. Belko A.A., Dremach G.E., Matsinovich M.S. The structure of animal morbidity with non-communicable diseases // *Veterinary Journal of Belarus*. Minsk, 2022. No. 1(16). pp. 3-6.
2. Semenov V.G., Simurzina E.P. A method for increasing milk productivity and quality of cows' milk // *Mat. intl. scientific-practical. Conf. dedicated to the 90th anniversary of the birth of A.I. Kuznetsova*. Cheboksary, 2020, pp. 142-148.
3. Simurzina E.P. Morbidity and safety, productive and reproductive qualities of imported Holstein cattle // *Youth and innovations: Mat. XV All-Russian scientific-practical. conf. young scientists, graduate students and students*. Cheboksary, 2019. S. 198-203.
4. Chuck G.M., Mansell P.D., Stevenson M.A. Factors affecting colostrum quality in Australian pasture-based dairy herds // *Australian veterinary journal* // 2017. 95(11). P. 421-426.
5. Godden, S. Colostrum management for dairy calves // *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2008. T. 24. №. 1. P. 19-39.
6. Phipps A. J., Beggs D. S., Murray A. J., Mansell P. D., Pyman M.F., Factors associated with colostrum immunoglobulin G concentration in Northern-Victorian dairy cows. *Australian veterinary journal*. 2017. 95(7). P. 237-243.
7. Reschke C., Schelling E., Michel A., Remy-Wohlfender F., Meylan M. Factors associated with colostrum quality and effects on serum gamma globulin concentrations of calves in Swiss dairy herds. *Journal of veterinary internal medicine*. 2017. 31(5). P. 1563-1571.
8. Semenov V., Mudarisov R., Larionov G. Prevention of transport stress in imported heifers improves their health status and their productive parameters // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science: International AgroScience Conference*, Cheboksary, 2020. P. 012025. – DOI 10.1088/1755-1315/433/1/012025.
9. Semenov V., Maykotov A., Kondruchina S. Veterinary and hygienic methods of directed reproduction in formation of healthy herds of cows // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, Cheboksary. 2021. P. 012-021. DOI 10.1088/1755-1315/935/1/012021.
10. Soberon F., Raffrenato, E., Everett, R.W., Van Amburgh, Prewaning milk replacer intake and effects on long-term productivity of dairy calves // *Journal of Dairy Science*. 2012. T. 95. №. 2. P. 783-793.



Ветеринарный врач. 2023. № 2. С. 41 – 46.  
The Veterinarian. 2023; (2): 41 – 46

Научная статья  
УДК 579.62  
DOI: 10.33632/1998-698X\_2023\_2\_41

### **Дифференциация штаммов *Bacillus anthracis* методом анализа температур плавления продуктов ПЦР, полученных после амплификации VNTR локусов**

Наиль Анисович Фахрутдинов, Елизавета Алексеевна Анисимова, Динис Анатолиевич Миргазов, Эльмира Наримановна Мустафина, Константин Анатольевич Осянин

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», Казань, Россия

Автор, ответственный за переписку: Елизавета Алексеевна Анисимова, elizaveta-real@mail.ru

**Аннотация.** В настоящее время генотипирование штаммов *Bacillus anthracis* широко используется при проведении расследований вспышек сибирской язвы и осуществлении эпидемиологического надзора за данной инфекцией. В рамках данной работы проведено исследование десяти штаммов *B. anthracis* (семи вирулентных и трех вакцинных) с использованием мультилокусного VNTR-анализа. Для определения различий в исследуемых локусах использовали метод определения температур плавления ПЦР-продуктов в присутствии интеркалирующего красителя «EvaGreen». Данный методический подход позволил дифференцировать между собой восемь из десяти исследуемых штаммов *B. anthracis*. Также установлен размер повторов в локусах, температура плавления ПЦР-продуктов которых была идентична температурам плавления ампликонов тех же VNTR локусов референсного штамма СТИ-1. Таким образом, показана принципиальная возможность использования рассмотренной в данной работе методики для идентификации и дифференциации штаммов возбудителя сибирской язвы.

**Ключевые слова:** *Bacillus anthracis*; дифференциация; VNTR; MLVA; кривые плавления ампликонов

### **Differentiation of *Bacillus anthracis* strains by method based on melting points of the PCR products obtained after amplification the VNTR loci**

Nail A. Fakhrutdinov, Elizaveta A. Anisimova, Dinis A. Mirgazov, Elvira N. Mustafina, Konstantin A. Osyenin

Federal State Budgetary Scientific Institution «Federal Center for toxicological, radiation, and biological safety», Kazan, Russia.

Corresponding author: Elizaveta A. Anisimova, elizaveta-real@mail.ru

**Abstract.** Currently, genotyping of strains of *Bacillus anthracis* is widely used to investigate outbreaks of anthrax and the implementation of epidemiological surveillance of this infection. In this paper, the ten strains of *B. anthracis* (seven virulent and three vaccine) were studied by multiple-locus VNTR analysis. To determine the difference in the studied loci was used the method for determining the melting points of PCR products in the presence of the intercalating dye «EvaGreen». This methodological approach made it possible to differentiate eight out of ten studied *B. anthracis* strains. The size of the repeats in the loci was also determined, the melting temperature of the PCR products of which was identical to the melting temperatures of the amplicons of the same VNTR loci of the reference strain СТИ-1. Thus, the fundamental possibility of using the technique considered in the present study for the identification and differentiation of strains of the anthrax pathogen has been shown.

**Keywords:** *Bacillus anthracis*; differentiation; VNTR; MLVA; amplicon melting curves

**Введение.** Бактерии *Bacillus anthracis* являются возбудителем особо опасной зоонозной инфекции – сибирской язвы. Заражение домашнего скота и диких животных данным

заболеванием происходит чаще всего через споры, проглатываемыми ими на пастбищах [2]. Заражение человека может происходить тремя путями: через ссадины или порезы на коже, употребление в пищу мяса, инфицированного животного или через вдыхание спор [7, 10]. Важно отметить, что споры сибирской язвы устойчивы к абиотическим факторам окружающей среды и, как следствие, способны сохраняться в почве в течение нескольких десятилетий [6].

Каждый случай возникновения заболевания человека или животного с подозрением на сибирскую язву требует индикации возбудителя методами молекулярной диагностики. Вид *B. anthracis* принадлежит к таксономической группе *Bacillus cereus sensu lato*, в состав которой также входят *B. cereus* и *B. thuringiensis*. Вышеперечисленные виды обладают высоким генетическим сродством, поэтому их невозможно дифференцировать между собой с помощью большинства молекулярно-генетических подходов, в части методом ДНК-ДНК-гибридизации, по последовательностям 16S-23S рРНК и межгенным спейсерным областям *gugB-gugA* [10]. Штаммы *B. anthracis* также характеризуются незначительными генетическими отличиями внутри данного вида, что значительно затрудняет их дифференциацию между собой [4]. Для идентификации *B. anthracis* широкое применение находит молекулярное типирование, в частности мультилокусный анализ числа варибельных тандемных повторов (VNTR) под названием MLVA [5, 8]. Данный метод позволяет обнаружить внутривидовое разнообразие возбудителя сибирской язвы, а также определять географическое происхождение штамма

и источник инфекции. В основе проведения MLVA чаще всего лежит метод ПЦР с последующим разделением продуктов амплификации в агарозном геле электрофорезом [3]. Ограничением данного подхода является тот факт, что не все используемые для MLVA локусы имеют размер повтора более 10 п.о., т.е. являются агарозосовместимыми [5]. Идентификация числа повторов на таких коротких участках возможна только при помощи дорогостоящего оборудования и секвенирования.

В проведенном исследовании рассмотрена возможность применения метода, основанного на анализе температур плавления ампликонов в реальном времени для определения различий в VNTR-локусах. Для дифференциации ампликонов исследуемых VNTR-локусов применили технологию амплификации с использованием интеркалирующего красителя «EvaGreen». Механизм воздействия данного красителя заключается во встраивании между двумя комплементарными нуклеотидами в двухспиральной молекуле ДНК. При возбуждении красителя светом определенной длины волны он флуоресцирует. При денатурации ДНК и разрыве водородных связей флуоресценция отсутствует. Таким образом, при постепенном повышении температуры в амплификаторе и постоянной детекции возможно определение длины исследуемого ампликона по температуре плавления. Данный подход обладает такими преимуществами как быстрота проведения анализа и высокая чувствительность, также его применение не требует дорогостоящего оборудования [3]. Целью проведенного исследования являлась оценка эффективности проведения MLVA методом анализа кривых плавления продуктов ПЦР высокого разрешения для дифференциации *B. anthracis*.

**Материалы и методы.** В работе использовали десять штаммов возбудителя сибирской язвы: три вакцинных (*B. anthracis* СТИ-1, *B. anthracis* 55, *B. anthracis* «Onderste Pookt») и семь вирулентных штаммов *B. anthracis* различного географического происхождения, обозначенных в данной статье как *Kr*, *U-1*, *Km*, *Va*, *Izh*, *Uf*, *Vg*. Для безопасного выделения ДНК из культур клеток *B. anthracis* проводили обработку и обеззараживание биологического материала согласно МУК 4.2.2941-11 [1]. Для выделения ДНК использовали набор РНК-преп-М производства ООО «Медипалтех» (Россия). Все манипуляции выполняли в соответствии с инструкцией производителя.

Для проведения MLVA использовали восемь характерных для *B. anthracis* локусов тандемных повторов (*vrrA*, *vrrB1*, *vrrB2*, *vrrC1*, *vrrC2*, *CG3*, *pX01*, *pX02*). Амплификацию VNTR-локусов проводили с использованием праймеров, представленных ранее в работе [11].

ПЦР-смесь для постановки ПЦР-РВ содержала: 1,5 мкл 10×ПЦР-буфера с красителем «EvaGreen» (ЗАО «Синтол», Россия), 25 мМ раствора MgCl<sub>2</sub> (ЗАО «Синтол», Россия), 1,0 единицу Taq-полимеразы (ЗАО «Синтол», Россия), 2,5 мМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 5 рМ прямого и обратного праймера, 10 нг ДНК-матрицы, ddH<sub>2</sub>O (до 15 мкл). Амплификацию проводили по программе: начальная денатурация при 95 °С в течение 3 мин, 39 циклов: денатурация 95 °С – 10 с, отжиг олигонуклеотидов: 60 °С – 30 с (детекция по каналу FAM) и элонгацию 72 °С – 10 с. Параметры плавления: диапазон температур от 65 °С до 95 °С, шаг 0,2 °С – 5 с. Графический анализ кривых плавления продуктов амплификации проводили в программе CFX Manager™ («Bio-Rad», США).

ПЦР-смесь для классической ПЦР объемом 15 мкл содержала 2,5 мкл 10×ПЦР буфера, 1,5 мкл 25 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 пкМ каждого праймера, 2,5 мкл 2,5 мМ dNTP, 0,5 мкл Taq-полимеразы, 2,5 мкл ДНК матрицы, 5 мкл ddH<sub>2</sub>O. Амплификацию проводили по программе: начальная денатурация ДНК при 95

°С в течение 3 мин, далее 45 циклов: денатурация 95 °С – 10 с, отжиг олигонуклеотидов 60 °С – 30 с, элонгация 72 °С – 10 с. ПЦР-продукты разделяли электрофорезом в 1,5 % агарозном геле в ТВЕ-буфере с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией с помощью UV-транслюминатора. Размер полученных фрагментов определяли путем сравнения фрагмента с маркером молекулярной массы ДНК — GeneRuler™ 100 bp DNA Ladders («Fermentas», Литва).

Для проведения ПЦР и ПЦР-РВ использовали амплификатор Real-Time C1000 с оптическим блоком CFX96 («Bio-Rad», США).

Биоинформационный анализ проводили с помощью программ Vector NTI 9.1 и баз данных ресурсов NCBI (<https://www.ncbi.gov>).

**Результаты исследований.** Для проведения MLVA использовали расширенный протокол, включающий анализ восьми локусов варибельных tandemных повторов, описанных ранее [9, 11]. В качестве референсного штамма использовали *B. anthracis* СТИ-1, поскольку его геном полностью секвенирован и представлен в базе данных GenBank. На первом этапе работы определили размер tandemных повторов с помощью *in silico* анализа хромосомной (GenBank CP066168) и плазмидной ДНК (GenBank CP007661.1) *B. anthracis* СТИ-1. Локализация праймеров показала, что в геноме штамма *B. anthracis* СТИ-1 ожидаемый ампликон локуса *vrrA* размером 314 п.о. содержит четыре повтора по 12 п.о., *VrrB1* размером 229 п.о. – два повтора по 9 п.о., *VrrB2* размером 162 п.о. – три повтора по 9 п.о., *VrrC1* размером 616 п.о. – два повтора по 36 п.о., *VrrC2* размером 604 п.о. – два повтора по 72 п.о., *CG3* размером 156 п.о. – один повтор по 5 п.о., *rXO1* размером 126 п.о. – шесть повторов по 3 п.о.

Далее определили пики плавления ПЦР-РВ продуктов амплифицируемых VNTR локусов исследуемых штаммов *B. anthracis*. ПЦР-РВ проводили с использованием красителя «EvaGreen» в трех повторениях. Обнаружили, что разница между повторами для большинства анализируемых локусов составляет 0,2 °С. Поэтому для дифференцировки штаммов *B. anthracis* допустимым отличием в показаниях приняли значения от 0,2 °С. Результаты молекулярно-генетического анализа исследуемых штаммов *B. anthracis* представлены в таблице 1.

Установили, что полученные после амплификации локуса *VrrA1* кривые плавления вирулентного штамма *Vg* и вакцинного *B. anthracis* 55 идентичны кривой плавления того же локуса *B. anthracis* СТИ-1 и, вероятно, содержат в локусе *VrrA1* четыре tandemных повтора. Четыре вирулентных штамма (*U-1*, *Km*, *Ba* и *Uf*) демонстрируют более высокую температуру плавления ампликонов в сравнении с *B. anthracis* СТИ-1, что говорит о большем количестве tandemных повторов в локусе *VrrA1*. Наибольшую температуру плавления демонстрирует вакцинный штамм *B. anthracis* «Onderste Pookt» – 85,4 °С. Самой низкой температурой плавления ампликона *VrrA1* обладает штамм *Kr* и, как следствие, характеризуется наименьшим количеством повторов в локусе *VrrA1*.

Вирулентные штаммы (*Izh* и *Vg*) и вакцинные (55 и «Onderste Pookt») обладают идентичными с *B. anthracis* СТИ-1 кривыми плавления ампликонов *VrrB1* и, как следствие, содержат в локусе *VrrB1* два tandemных повтора. Из данных, представленных в таблице 1, следует, что штаммы (*Km*, *U-1*, *Km* и *Ba*) содержат в данном локусе наименьшее количество повторов, а *Uf* наибольшее.

Девять из десяти исследованных штаммов, в том числе и референсный *B. anthracis* СТИ-1, характеризуются одинаковыми температурами плавления ампликона *VrrB2*, следовательно, содержат три tandemных повтора в данном локусе. Штамм *Kr* обладает наименьшей температурой плавления ампликона *VrrB2* и, как следствие, содержит в данном локусе два или один tandemный повтор.

Полученные данные о кривых плавления ампликонов *CG3* свидетельствуют о том, что все штаммы, кроме *Izh* и *Uf*, содержат в локусе *CG3* один tandemный повтор, характерный для *B. anthracis* СТИ-1. Tandemные повторы в данном локусе у штаммов *Izh* и *Vg*, вероятно, отсутствуют.

Температуры плавления ПЦР-продуктов, полученные после амплификации локусов *VrrC1* и *VrrC2*, позволили разделить все исследуемые штаммы на два кластера. Вирулентные штаммы *Izh*, *Uf* и *Vg*, а также вакцинные 55 и «Onderste Pookt» характеризуются идентичными с референсным штаммом температурами плавления данных локусов. Температура плавления ПЦР-продуктов, полученная после амплификации локуса *VrrC1*, у штаммов *Kr*, *U-1*, *Km* и *Ba* превышала значение, полученное для *B. anthracis* СТИ-1. Из чего можно сделать заключение, что исследованные штаммы несут в локусе *VrrC1* три или более tandemных повтора. Данные штаммы обладают более низкой температурой плавления ампликона *VrrC2* в сравнении с СТИ-1 и, вероятно, несут в данном локусе один повтор.

Детектировали, что штаммы *Kr*, «Onderste Pookt» и СТИ-1 обладают наименьшей температурой плавления ампликона *rXO1* – 74,2 °С. Заключение, что данные бактерии содержат на плазмиде *rXO1* шесть tandemных повторов. Остальные исследованные штаммы *B. anthracis*, вероятно, содержат в локусе *rXO1* более шести повторов. Количество повторов в локусе *rXO2* для исследованных штаммов *B. anthracis* установить невозможно ввиду отсутствия данного маркера у бактерий *B. anthracis* СТИ-1.

Отметим, что отсутствие плазмиды *pXO2* у *B. anthracis* СТИ-1, 55 и «Onderstepoort» является их характерным признаком [4].

Как видно из представленных в таблице 1 данных, большинство исследованных штаммов возбудителя сибирской язвы характеризуются уникальным профилем температур ПЦР-продуктов, полученных после амплификации VNTR-локусов. Исключением являются штаммы *U-1* и *Km*, демонстрирующие одинаковые профили и, вероятно, относящиеся к одному генотипу. Таким образом, методический подход, основанный на анализе температур плавления VNTR-локусов, позволил дифференцировать между собой восемь из десяти исследуемых штаммов.

Отметим, что используемый в рамках данной работы MLVA подход, основанный на разделении VNTR-ампликонов электрофорезом, позволил определить только примерные размеры VNTR локусов исследуемых штаммов (таблица 1) и, как следствие, может использоваться только в качестве оценочного.

**Заключение.** Полученные результаты имеют потенциал использования для разработки методического подхода для быстрой дифференциации штаммов *B. anthracis*, основанного на мониторинге в реальном времени процесса плавления амплифицированных VNTR-локусов. Поскольку размер повторов установлен только в тех локусах, температура плавления ПЦР-продуктов которых была идентична температурам плавления ампликонов тех же VNTR локусов штамма СТИ-1, в дальнейшем необходимо провести секвенирование исследованных в данной работе локусов для создания базы данных температур плавления VNTR-последовательностей, соотносящиеся с их размером. В перспективе метод идентификации и дифференциации штаммов *B. anthracis*, основанный на кривых плавления VNTR-ампликонов, будет иметь преимущества перед другими методами благодаря меньшим материальным и временным затратам и, таким образом, может быть полезным в работе диагностических лабораторий.

Таблица 1 – Генетические профили исследуемых штаммов *B. anthracis*, полученные по результатам MLVA

Штамм	Локус															
	VrrA1		VrrB1		VrrB2		VrrC1		VrrC2		CG3		pXO1		pXO2-at	
	температура плавления ампликона,	размер ампликона, п.о.	температура плавления ампликона,	размер ампликона, п.о.	температура плавления ампликона,	размер ампликона, п.о.	температура плавления ампликона,	размер ампликона, п.о.	температура плавления ампликона,	размер ампликона, п.о.	температура плавления ампликона,	размер ампликона, п.о.	температура плавления ампликона,	размер ампликона, п.о.	температура плавления ампликона,	размер ампликона, п.о.
<i>Kr</i>	84,2	314	85,8	210	85,4	150	84,2	680	83,4	570	75,0	156	74,2	126	78,2	150
<i>U-1</i>	85,0	320	85,8	210	85,8	120	84	680	83,4	570	75,2	156	74,6	150	78,2	180
<i>Km</i>	85,0	320	86,0	210	85,8	150	84	680	83,6	570	75,2	156	74,6	150	78,4	150
<i>Ba</i>	85,0	320	86,0	210	86,0	150	84	680	83,6	570	75,2	156	74,8	150	78,4	150
<i>Izh</i>	84,0	290	86,4	230	85,8	165	82	650	85,0	604	74,2	150	77,1	160	75,4	140
<i>Uf</i>	85,0	320	86,8	270	86,0	170	82	616	85,0	604	75,2	156	74,8	150	78,2	180
<i>Vg</i>	84,4	310	86,4	230	85,8	170	82	616	84,8	604	74	150	78,0	160	75,2	150
<b>СТИ-1</b>	84,4	<b>314</b>	86,2	<b>229</b>	85,8	<b>162</b>	82	<b>616</b>	85,0	<b>604</b>	75,2	<b>156</b>	74,2	<b>126</b>	-	-
55	84,4	310	86,4	230	85,8	170	82	616	85,0	604	75,5	156	74,7	150	-	-
«Onderste Pookt»	85,4	320	86,4	230	85,8	170	82	616	85,0	604	75,2	156	74,2	126	-	-

Примечание – Полужирным шрифтом выделены значения полученные *in silico*.

### Литература

1. МУК 4.2.2941-11 Порядок организации и проведения лабораторной диагностики сибирской язвы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней : методические указания : введены впервые : дата введения 2011-07-14 / разработан Федеральным казенным учреждением здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора. – Москва : Роспотребнадзор, 2011. – 55 с.
  2. Особенности природной очаговости сибирской язвы и экологии *Bacillus anthracis* / А. П. Родионов, Е. А. Артемьева, Л. А. Мельникова [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2021. – Т. 2, № 37. – С. 151–158.
  3. Современные подходы к генотипированию возбудителей особо опасных инфекций / О. С. Бондарева, С. С. Савченко, Г. А. Ткаченко [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2014. – Т. 1. – С. 34–44.
  4. Сравнительный мультилокусный VNTR- и SNP-анализ вакцинных штаммов *Bacillus anthracis* / М. В. Афанасьев, Е. В. Кравец, З. Ф. Дугаржапова [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2014. – Т. 29, № 2. – С. 86–92.
  5. Тимофеев, В. С. Генотипирование *Bacillus anthracis* и близкородственных микроорганизмов / В. С. Тимофеев, И. В. Бахтеева, И. А. Дятлов // Генетика. – 2018. – Т. 54, № 1. – С. 3–14.
  6. Эпизоотическая характеристика стационарно неблагоприятных по сибирской язве пунктов в Республике Татарстан / А. П. Родионов, Е. А. Артемьева, Л. А. Мельникова, М. А. Косарев // Ветеринарный врач. – 2021. – № 1. – С. 50–56.
  7. Genetic characterization of *Bacillus anthracis* strains circulating in Italy from 1972 to 2018 / V. Rondinone, L. Serrecchia, A. Parisi [et al.] // PLoS ONE. – 2020. – Vol. 15, No 1. – P. e0227875.
  8. Genotyping and population diversity of *Bacillus anthracis* in China based on MLVA and canSNP analysis / D. Wang, B. Wang, L. Zhu [et al.] // Genotyping and population diversity of *Bacillus anthracis* in China based on MLVA and canSNP analysis. Microbiological Research. – 2020. – Vol. 233, No 1. – P. 126414.
  9. Indication and Identification of *Bacillus anthracis* Isolates from the Middle Volga Region by Multi-Primer PCR / N. M. Aleksandrova, I. A. Rogozhina, T. K. Faizov [et al.] // BioNanoScience. – 2018. – Vol. 8, No 1. – P. 434–440.
  10. Molecular Characterization of Korean *Bacillus anthracis* Isolates by Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis and Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis / C. Ryu, K. Lee, H. Hawng [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2005. – Vol. 71. – P. 4664–4671.
  11. Multiplelocus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis* / P. Keim, L. B Price, A. M. Klevytska [et al.] // J Bacteriol. – 2000. – Vol. 182. – P. 2928–2936.
- ### References
1. МУК 4.2.2941-11 The procedure for organizing and conducting laboratory diagnostics of anthrax for laboratories of the territorial, regional and federal levels : guidelines: introduced for the first time : date of introduction 2011-07-14 / developed by the Federal Public Health Institution «Stavropol Research Anti-Plague Institute» Rospotrebnadzor. – Moscow : Rospotrebnadzor, 2011. – 55 p.
  2. Features of anthrax natural foci and *Bacillus anthracis* ecology / A. P. Rodionov, E. A. Artemeva, L. A. Melnikova [et al.] // Veterinary Science Today. – 2021. – Vol. 2, No 37. – P. 151–158.
  3. Modern approaches to genotyping of causative agents of particularly dangerous infections / O. S. Bondareva, S. S. Savchenko, G. A. Tkachenko [et al.] // Epidemiology and infectious diseases. – 2014. – Vol. 1. – P. 34–44.
  4. Comparative multilocus vntr and snp analysis of *Bacillus anthracis* vaccine strains / M. V. Afanasiev, E. V. Kravets, Z. F. Dugarzhapova [et al.] // Molecular Genetics, Microbiology and Virology. – 2014. – Vol. 29, No 2. – P. 86–92.
  5. Timofeev, V. S. Genotyping of *Bacillus anthracis* and closely related microorganisms. Russian Journal of Genetics / V. S. Timofeev, I. V. Bakhteeva, I. A. Dyatlov // Russian Journal of Genetics. – 2018. – Vol. 54, No 1. – P. 3–14.
  6. Epizootic characteristics of stationary anthrax unfavorable points in the Republic of Tatarstan / A.P. Rodionov, E.A. Artemieva, L.A. Melnikova, M.A. Kosarev // Veterinarian. – 2021. – No 1. – P. 50–56.
  7. Genetic characterization of *Bacillus anthracis* strains circulating in Italy from 1972 to 2018 / V. Rondinone, L. Serrecchia, A. Parisi [et al.] // PLoS ONE. – 2020. – Vol. 15, No 1. – P. e0227875.
  8. Genotyping and population diversity of *Bacillus anthracis* in China based on MLVA and canSNP analysis / D. Wang, B. Wang, L. Zhu [et al.] // Microbiological Research. – 2020. – Vol. 233, No 1. – P. 126414.
  9. Indication and Identification of *Bacillus anthracis* Isolates from the Middle Volga Region by Multi-Primer PCR / N. M. Aleksandrova, I. A. Rogozhina, T. K. Faizov [et al.] // BioNanoScience. – 2018. – Vol. 8, No 1. – P. 434–440.
  10. Molecular Characterization of Korean *Bacillus anthracis* Isolates by Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis and Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis / C. Ryu, K. Lee, H. Hawng [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2005. – Vol. 71. – P. 4664–4671.
  11. Multiplelocus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis* / P. Keim, L. B Price, A. M. Klevytska [et al.] // J Bacteriol. – 2000. – Vol. 182. – P. 2928–2936.

Ветеринарный врач. 2023. № 2. С. 47 – 54.  
The Veterinarian. 2023; (2): 47 – 54

Научная статья  
УДК 579.0  
DOI: 10.33632/1998-698X\_2023\_2\_47

### **Антибиотикочувствительность аэробных представителей кишечной нормобиоты домашних питомцев, обитающих в г. Челябинск**

Хайдаршина Наиля Эмильевна<sup>1</sup>, Даллакян Карен Вачаганович<sup>2</sup>, Тимербаева Разалия Рустамовна<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Челябинский государственный университет, кафедра микробиологии, иммунологии и общей биологии, Челябинск, Россия.

<sup>2</sup> Фонд зоозащиты «Спаси меня», Челябинск, Россия.

<sup>3</sup> Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана, Казань, Россия.  
Автор, ответственный за переписку: Хайдаршина Наиля Эмильевна, neh-74@ya.ru

**Аннотация.** Состав нормобиоты организма человека и животных активно изучается. Отдельные представители аэробной микробиоты толстого отдела кишечника являются условно-патогенными микроорганизмами, которые все чаще переходят в группу возбудителей с приобретенной антибиотикостойчивостью. Изучение частоты встречаемости антибиотикорезистентных штаммов на региональном уровне, важно для создания списка высокоэффективных препаратов для стартовой терапии инфекционных патологий у людей и животных. В нашем исследовании были получены результаты антибиотикочувствительности аэробных представителей кишечной нормобиоты домашних питомцев (кошек и собак). Для выделенных культур стафилококков, энтерококков и отдельных видов энтеробактерий частота встречаемости штаммов чувствительных к клинически значимым препаратам составила более 75%.

**Ключевые слова:** домашние питомцы, аэробная нормобиота кишечника, условно-патогенные бактерии, антибиотикочувствительность, механизмы устойчивости к антимикробным препаратам.

### **Antibiotic sensitivity of aerobic representatives intestinal normobiota of pets living in Chelyabinsk**

Nailya E. Khaidarshina<sup>1</sup>, Karen V. Dallakyan<sup>2</sup>, Razaliya R. Timerbaeva<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

<sup>2</sup> Animal Protection Fund "Save Me", Chelyabinsk, Russia

<sup>3</sup> Kazan State Academy of Veterinary Medicine, Kazan, Russia

Corresponding author: Nailya E. Khaidarshina, [neh-74@ya.ru](mailto:neh-74@ya.ru)

**Abstract.** The composition of the normobiota of the human and animal organisms is being actively studied. Some representatives of the aerobic microbiota of the large intestine are opportunistic microorganisms that are increasingly moving into a group of pathogens with acquired antibiotic resistance. Monitoring the circulation of antibiotic-resistant strains in various human and animal populations is one of the main tasks regulated by the Strategy of the WHO, the European Union, and the Russian Federation. The study of the frequency of occurrence of antibiotic-resistant strains at the regional level is important for creating a list of highly effective drugs for the initial treatment of infectious pathologies in humans and animals. In our study, the results of antibiotic sensitivity of aerobic representatives of the intestinal normobiota of pets (cats and dogs) were obtained. For the studied cultures of staphylococci, enterococci and certain types of enterobacteria, the frequency of occurrence of strains sensitive to clinically significant drugs was more than 75%.

**Keywords:** pets, intestinal aerobic normobiota, opportunistic bacteria, antibiotic sensitivity, mechanisms of resistance to antimicrobial drugs

**Введение.** После открытия в 1940 году пенициллина в науку и повседневную жизнь людей вошло понятие «антибиотик». Эти соединения стали основой ценных лекарственных препаратов для лечения большого числа бактериальных инфекций [1]. Одновременно с данными открытиями ученые пришли

к пониманию, что существует определенная часть возбудителей, в отношении которых эти соединения не активны.

В настоящее время устойчивость к антимикробным препаратам делят на природную (встречается у подавляющего большинства штаммов вида) и приобретенную (регистрируется у части штаммов бактериального вида, который в норме обладает чувствительностью к антибиотикам) [2].

Природная антибиотикорезистентность, согласно наиболее популярной теории, возникла у микроорганизмов сразу после появления способности продуцировать антимикробные соединения около 3,5 миллиардов лет назад [3]. У продуцентов антибиотиков устойчивость вырабатывалась по мере формирования путей биосинтеза этих соединений как система защиты от негативного влияния собственных продуктов. У непродуцентов резистентность формировалась как защитный механизм от антимикробных соединений, поступающих в среду их обитания. А вот клинические изоляты, согласно предположений, получали гены от общих предшественников из состава продуцентов и непродуцентов антимикробных соединений [1]. Таким образом, длительный период времени эволюция генов резистентности шла под воздействием селективных факторов, присутствовавших в окружающей среде. В результате этого в естественных микроценозах сформировались и присутствует до настоящего времени в невысоких титрах популяции микробиоты с природной антибиотикоустойчивостью.

В период «антибиотической эры» с 70-х годов 20 века по настоящее время в областях антропогенной активности регистрируется быстрое нарастание микробиоты (до 70% и более) с признаками приобретенной устойчивости, преимущественно из состава условно-патогенных видов бактерий [4].

Нормативная документация международного и российского уровня описывает следующие сферы деятельности человека, в которых активно формируются штаммы микроорганизмов с приобретенной антибиотикорезистентностью – это медицина с ее амбулаторной и госпитальной средой, животноводство, рыбоводство [5-7]. Выделение этих сфер в особую категорию связано с их активным, часто нерациональным оборотом антибактериальных препаратов. Кроме того, объекты этих сфер являются потенциальными источниками контаминации антибиотикоустойчивой микробиотой почвы, водных источников, продуктов питания, диких животных.

Домашние непродуктивные животные (животные-компаньоны) не входят в группу объектов «особого контроля» на наличие антибиотикоустойчивых штаммов бактерий. Между тем, их можно отнести к потенциальным источникам антибиотикорезистентных микроорганизмов для людей, т.к. они имеют тесный механический контакт с хозяином. Наличие устойчивой к определенным антибиотикам микробиоты описано у различных видов домашних непродуктивных животных. Это метициллинрезистентные *S.aureus*, обнаруженные у домашних кошек; устойчивые к бета-лактамам *Salmonella spp.* и к фторхинолонам *E.coli*, выделенные при инфекциях мочевых путей у домашних собак [8-10] и др. Периодический обмен такой микробиотой между питомцем и хозяином может создавать благоприятные условия для обмена генетической информацией между бактериями животного и хозяина.

Мониторинг за циркуляцией антибиотикорезистентных штаммов в различных популяциях людей и животных является одной из основных задач, регламентируемых Стратегией ВОЗ, Евросоюза, РФ [5-7]. Изучение частоты встречаемости антибиотикорезистентных штаммов на региональном уровне, а также механизмов встречающейся устойчивости, важно для создания списка высокоэффективных препаратов для стартовой (эмпирической) терапии инфекционно-воспалительных процессов как у людей, так и животных.

**Цель:** установить антибиотикочувствительность и механизмы устойчивости у аэробных представителей кишечной нормобиоты животных-компаньонов, обитающих в г. Челябинск.

**Задачи.** Для достижения цели были поставлены следующие задачи.

1. Выделить и идентифицировать изоляты аэробных видов кишечной нормобиоты домашних питомцев.
2. Определить антибиотикочувствительность выделенных бактериальных культур.
3. Установить механизм антибиотикорезистентности у исследованных штаммов.

**Материалы и методы.** Исследования проводились в учебной лаборатории микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет».

*Материалом для выделения микробиоты* являлись испражнения здоровых домашних кошек и собак различных пород, проходивших профилактический осмотр у ветеринарного врача в частной клинике «Спаси меня» (г. Челябинск). Всего обследовано 49 животных в возрасте 1-4 года, которые не принимали антибиотики последние 3 месяца.



Клинический материал объемом 3-4 г собирался в стерильные контейнеры хозяевами животных. Собранные образцы доставляли в лабораторию в течении 2 ч с момента получения; при отсутствии возможности доставки в эти сроки, материал переносили в консервирующую среду.

Из 49 клинических образцов выделено 102 штамма аэробных условно-патогенных бактерий.

*Выделение аэробных представителей кишечной нормобиоты* выполняли путем посева испражнений количественным методом по Lindsey [11]. Для этого отмеряли 1 г материала, добавляли 9 мл физиологического раствора, смесь разбивали с помощью стерильных стеклянных бус, полученную гомогенную суспензию высевали с помощью калиброванной бактериологической петли (5 мм) на следующие питательные среды: 5%-ый кровяной агар, Эндо, желточно-солевой агар. Чашки с посевами инкубировали при температуре 37°C в течение 24-48 ч.

*Идентификацию полученных культур* выполняли с помощью тест-систем «СТАФИтест 24», «ЭНКОККУСтест», «ЭНТЕРОтест 24 Н» («LaChema» Чехия).

*Определение чувствительности к антибиотикам* у изучаемых штаммов выполняли диско-диффузионным методом согласно клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (Версия 2018) [12]. Контрольными штаммами являлись следующие тест-культуры: *S.aureus* ATCC 29213, *E.faecalis* ATCC 29212, *E.coli* ATCC 25922.

Фенотипическую детекцию устойчивости к бета-лактамам у представителей *Staphylococcus* spp. выполняли при использовании диска с цефокситином [12, 13], контрольный штамм – *S.aureus* NCTC 12493 (mecA). Продукцию индуцибельных метилаз стафилококками изучали при постановке D-теста [12] Синтез бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) у энтеробактерий обнаруживали с помощью «Метода двойных дисков» [14], контрольные штаммы – *K.pneumoniae* ATCC 700603 (SHV-18), *E.coli* ATCC 35218 (TEM-1). Возможность продукции карбапенемаз устанавливали, применяя «Метод двойных дисков» [15] и CIM [16]

*Генотипирование антибиотикорезистентных штаммов* выполняли методом ПЦР-real-time при использовании амплификатора «iCycler IQ5» («BioRad», США) [17]. Для выполнения теста использовали наборы one-step «Резистентность к цефалоспорином – 1 РВ. Выявление генов CTX-M», «Резистентность к цефалоспорином – 2 РВ. Выявление генов MecA» («Литех», Россия).

*Статистическая обработка полученных данных* заключалась в расчете доли штаммов (в %), которую снабжали 95%-ным доверительным интервалом (95% ДИ) для оценки точности измерений, вычисления выполняли методом Джеффриса [18]. Расчёты получали в пакете PAST (version 4.06) [19].

## Результаты исследований и обсуждение

1. *Видовой состав аэробных представителей кишечной нормобиоты домашних питомцев.* В состав нормобиоты кишечника домашних животных входят различные группы и виды микроорганизмов. Мы остановились на изучении аэробных представителей бактериальной микробиоты, т.к. большинство из них относится к условно-патогенным микроорганизмам, которые имеют особую роль в накоплении и распространении детерминант антибиотикоустойчивости среди клинических изолятов.

В ходе выделения и идентификации бактериальных культур из состава просветной микробиоты толстой кишки домашних питомцев были обнаружены следующие аэробные виды бактерий (табл. 1): представители рода *Staphylococcus* – 26 изолятов, рода *Enterococcus* – 28 культур, порядка *Enterobacterales* - 48 штаммов. Наибольшее число видов относилось к *Escherichia coli* – 43 изолята (42,0%) и *Enterococcus durans* – 13 культур (12,7%).

Таблица 1 — Частота выделения аэробных представителей кишечной нормобиоты у домашних животных (n=102)

№ п/п	Группа УПМ	Вид ми	Частота абс., шт.	Частота отн., %	95% ДИ по Джеффрису
1	Род <i>Staphylococcus</i> (26 штаммов)	<i>S.hominis</i>	8	7,8	[3,8; 14,3]
		<i>S.cohnii</i>	7	6,9	[3,1; 13,0]
		<i>S.epidermidis</i>	7	6,9	[3,1; 13,0]
		<i>S.hyicus</i>	2	2,0	[0,4; 6,1]
		<i>S.haemolyticus</i>	1	1,0	[0,1; 4,5]
		<i>S.aureus</i>	1	1,0	[0,1; 4,5]
2	Род <i>Enterococcus</i> spp. (28 штаммов)	<i>E.durans</i>	13	12,7	[7,3; 20,2]

		<i>E.gallinarum</i>	5	4,9	[1,9; 10,4]
		<i>E.dispar</i>	4	3,9	[1,3; 9,1]
		<i>E.faecalis</i>	2	2,0	[0,4; 6,1]
		<i>E.faecium</i>	2	2,0	[0,4; 6,1]
		<i>E.avium</i>	2	2,0	[0,4; 6,1]
3	Порядок Enterobacterales (48 штаммов)	<i>Escherichia coli</i>	43	42,0	[32,9; 51,8]
		<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	2,9	[0,8; 7,6]
		<i>Citrobacter freundii</i>	1	1,0	[0,1; 4,5]
		<i>Hafnia alvei</i>	1	1,0	[0,1; 4,5]
	Итого		102	100,0	

2. Антибиотикочувствительность выделенных штаммов стафилококков, энтерококков и энтеробактерий. Согласно клиническим рекомендациям «Определение чувствительности к антимикробным препаратам» [12] для разных видов одного рода/ порядка прокариот применяется единый набор антибиотиков, которые природно активны в отношении этой группы. Этот список содержит большое число препаратов, поэтому нами были выбраны единичные наименования, которые наиболее характерно описывают антибиотикочувствительность.

Для *Staphylococcus spp.* были выбраны диски с цефокситином (маркер чувствительности ко всем препаратам группы бета-лактамов), эритромицином и клиндамицином (маркеры чувствительности ко всем соединениям группы макролидов и линкозамидов), норфлоксацином (скрининговый препарат в отношении всех фторхинолонов), амикацином, линезолидом (один из самых молодых антибиотиков, разработанных в отношении грамположительных возбудителей). Полученные результаты (табл. 2) свидетельствуют о том, что от домашних питомцев с наибольшей частотой выделялись штаммы стафилококков чувствительные к цефокситину (92,3%), норфлоксацину (84,6%), линезалиду (76,9%) Наименьшая число чувствительных культур обнаружено в отношении эритромицина (38,5%).

Для *Enterococcus spp.* были использованы диски с ампициллином (маркер чувствительности к пенициллинам и ингибитор-защищенным средствам), имипенемом (единственный препарат выбора из состава бета-лактамов в случае устойчивости к пенициллинам), гентамицином, норфлоксацином (скрининговый препарат в отношении всех фторхинолонов), ванкомицином, линезолидом (современный антибиотик, разработанный против грамположительных возбудителей). Наибольшее число чувствительных штаммов энтерококков обнаруживалось в отношении ванкомицина (100,0%), норфлоксацина (92,9%), ампициллина и гентамицина (по 89,3%). Остальные антибактериальные препараты (имипенем и линезолид) проявляли сниженную активность.

Для представителей порядка Enterobacterales применяли диски, нагруженные следующими антибактериальными соединениями: амоксицилин-клавуланат, цефотаксим, цефтазидим (три перечисленных препарата позволяют обнаруживать устойчивость ко всем бета-лактамам, кроме карбапенемов), меропенем (предварительный индикатор устойчивости ко всем бета-лактамам), левофлоксацин (скрининг чувствительности ко всем фторхинолонам), амикацин. В нашем исследовании получены результаты чувствительности более 90% культур в отношении цефотаксима, цефтазидима, меропенема. Остальные препараты (амоксиклав, левофлоксацин, амикацин) проявляли активность для более 80-89% штаммов.

Таблица 2 — Частота встречаемости антибиотикочувствительных штаммов из состава представителей нормобиоты кишечника домашних животных

№ п/п	Группа УПМ	Антибактериальный препарат	Частота абс., шт.	Частота отн., %	95% ДИ по Джеффрису
1	<i>Staphylococcus spp.</i> (n=26)				
		Цефокситин	24	92,3	[77,5; 98,4]
		Эритромицин	10	38,5	[21,8; 57,6]
		Клиндамицин	14	53,8	[35,1; 71,8]
		Норфлоксацин	22	84,6	[67,5; 94,6]
		Амикацин	12	46,2	[28,2; 64,9]
		Линезолид	20	76,9	[58,5; 89,7]

2	Enterococcus spp. (n=28)				
		Ампициллин	25	89,3	[74,1; 96,9]
		Имипенем	20	71,4	[53,2; 85,5]
		Гентамицин	25	89,3	[74,1; 96,9]
		Норфлоксацин	26	92,9	[79,0; 98,5]
		Ванкомицин	28	100,0	[91,5; 100,0]
		Линезолид	20	71,4	[53,2; 85,5]
3	Enterobacteriaceae (n=48)				
		Амоксилав	43	89,6	[78,7; 95,9]
		Цефотаксим	46	95,8	[87,3; 99,1]
		Цефтазидим	45	93,8	[84,3; 98,2]
		Меропенем	47	97,9	[90,7; 99,8]
		Левифлоксацин	42	87,5	[76,0; 94,6]
		Амикацин	41	85,4	[73,5; 93,2]

3. *Характеристика механизмов антибиотикоустойчивости исследованной микробиоты.* Бета-лактамы являются одними из ведущих препаратов для лечения инфекций различной локализации, вызванных широким спектром возбудителей. К настоящему времени описано 4 биохимических механизма устойчивости к этим соединениям: ферментативная инактивация, модификация мишени действия, снижение проницаемости клеточных структур, избыточный синтез белков-переносчиков. Каждый из этих механизмов обеспечивается большим числом способов реализации устойчивости, от которых в конечном итоге зависит выбор препаратов для терапии [2].

Поэтому следующую задачу, которую мы решали в ходе нашего исследования, было установление эпидемически значимых механизмов устойчивости к бета-лактамам с помощью фенотипических (выявление на агаре) и молекулярно-генетических методов (обнаружение генов резистентности в ПЦР). При использовании первой группы методов мы устанавливали наличие возможного механизма антибиотикоустойчивости, т.е. выполняли скрининг; а в процессе изучения генотипа устанавливали точный механизм резистентности.

В исследование были включены только культуры стафилококков и энтеробактерий, т.к. эти микроорганизмы отличаются наличием механизмов, обеспечивающих устойчивость почти ко всем препаратам бета-лактамов, а также имеют склонность к быстрому распространению резистентных популяций. Полученные результаты представлены в таблице 3.

В нашем эксперименте выявлено 7,7% культур стафилококков (2 штамма *S.epidermidis*), обладающих метициллинрезистентностью, у которых обнаружен ген *mecA* Метициллинустойчивость стафилококков – механизм, известный ученым уже более 20 лет. Обеспечивается наличием гена *mecA*, который кодирует в клетке бактерий дополнительный пенициллинсвязывающий белок ПСБ2а, обладающий низкой аффинностью к бета-лактамам. В случае инфекции, вызванной возбудителем с таким типом резистентности, лечение любым препаратом из группы бета-лактамов становится не эффективным.

В ходе изучения чувствительности к бета-лактамам у энтеробактерий было установлено, что 4,2% культур (5 штаммов *E.coli*) показали устойчивость к цефалоспорином 3 поколения (цефотаксим, цефтазидим). Такой результат является показанием для изучения возможного синтеза бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС). С помощью фенотипического метода было установлено, что все 5 штаммов продуцируют эти ферменты, а генотипически установлен тип фермента –  $\text{bla}_{\text{CTX-M}}$ . Энтеробактерии, которые обладают таким механизмом устойчивости, клинически становятся нечувствительны ко всем препаратам группы бета-лактамов, кроме карбапенемов.

Еще 1 штамм *E.coli* показал устойчивость к меропенему, что является показанием для дальнейшего изучения механизма резистентности. При постановке фенотипических тестов («метод двойных дисков» и СИМ) было установлено отсутствие такого опасного механизма, как синтез карбапенемаз, который приводит к устойчивости культуры почти ко всем бета-лактамам соединениям. В связи с получением отрицательного результата при изучении фенотипа, генотипическое исследование этого штамма не выполнялось.

Таблица 3 - Частота встречаемости антибиотикорезистентных штаммов, выявленных фенотипическим и генотипическим методом

№ п/п	Группа УПМ	Механизм устойчивости, клиническое значение	Количество фенотипически выявленных устойчивых штаммов, %	Название гена/ число выявленных устойчивых штаммов, %
1	Staphylococcus spp. (n=26)	Метициллин устойчивость; неэффективность всех бета-лактамов	7,7	mecA 7,7
2	Enterobacteriaceae (n=48)	Синтез БЛРС; неэффективность пенициллинов, цефалоспоринов, монобактамов	4,2	СТХ-М 4,2
		Синтез карбапенемаз; неэффективность пенициллинов, цефалоспоринов, карбапенемов, монобактамов	0,0	-

**Заключение.** Состав нормобиоты организма человека и животных активно изучается. В нашем исследовании рассматривался состав просветной кишечной аэробной нормобиоты домашних животных, которых нередко также называют животные-компаньоны или питомцы. Нами обнаружены представители родов *Staphylococcus* 25,5% (виды *S.hominis*, *S.cohnii*, *S.epidermidis*, *S.hyicus*, *S.haemolyticus*, *S.aureus*); *Enterococcus* 27,5% (виды *E.durans*, *E.gallinarum*, *E.dispar*, *E.faecalis*, *E.faecium*, *E.avium*); порядка *Enterobacteriales* 47,0% (*Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*). Большинство этих представителей также входят в состав транзитной или об лигатной микробиоты человека.

Выделенные из состава нормобиоты аэробные представители относятся к группе условно-патогенных бактерий, которым отводится все более пристальное внимание ученых в связи с нарастающим числом популяций с признаками приобретенной антибиотикорезистентности. Мониторинг антибиотикочувствительности условно-патогенных возбудителей человека и животных – одна из важных задач лабораторной службы. В нашей работе установлена чувствительность к антимикробным препаратам у стафилококков в отношении цефокситина 92,3%, норфлоксацина 84,6, линезолида 76,9, клиндамицина 53,8, амикацина 46,2, эритромицина 38,5%. Для энтерококков наблюдалась чувствительность к ванкомицину у 100,0% штаммов, норфлоксацину 92,9, ампициллину и гентамицину 82,3, имепенему и линезолиду 71,4%. Энтеробактерии показали чувствительность у 97,9% изолятов к меропенему, 95,8 цефотаксиму, 93,8 к цефтазидиму, 89,6 амоксиклаву, 87,5 левофлоксацину, 85,4% амикацину.

Остальные исследованные штаммы относились к категории резистентных. Значение их устойчивости для клиники и эпидемиологии зависит от механизма, который заложен в геноме бактериальных клеток. Большинство этих изолятов были не опасны, т.к. частота их встречаемости слишком низка, либо скорость распространения детерминант устойчивости очень медленная. Между тем в нашем исследовании выявлены два наиболее опасных механизма резистентности – это метициллинустойчивость у 7,7% стафилококков (2 штамма *S.epidermidis*), которая обеспечивает этим культурам отсутствие активности всех бета-лактамов. А также синтез bla<sub>СТХ-М</sub> у 4,2% энтеробактерий (5 штаммов *E.coli*), которые клинически считаются нечувствительными ко всем препаратам группы пенициллинов, цефалоспоринов, монобактамов.

### Литература

1. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам: резистомы, её объём, разнообразие и развитие/ К. А. Виноградова, В. Г. Булгакова, А. Н. Полин, П. А. Кожевин // Антибиотики и химиотерапия. – 2013. – Т. 58, № 5–6. – С. 38–48.
2. Сидоренко, С. В. Механизмы резистентности микроорганизмов / С. В. Сидоренко, М. В. Эйдельштейн // Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. – Смоленск : МАКМАХ, 2007. – С. 19–32.
3. Martinez, J. L. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria // Proc Biol Sci. – 2009. – Vol. 276, № 1667. – P. 2521–2530. – DOI 10.1098/rspb.2009.0320.
4. Chait, R. What counters antibiotic resistance in nature? / R. Chait, K. Vetsigian, R. Kishony // Nature Chem. Biol. – 2012. – Vol. 8, No 1. – P. 2–5. – DOI 10.1038/nchembio.745.
5. Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам. – URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/66872?locale-attribute=ru&mode=full/> (дата обращения: 20.09.2022).

6. Борьба с устойчивостью к антибиотикам с позиций безопасности пищевых продуктов в Европе. – URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/326399/> (дата обращения: 20.09.2022).
7. Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в РФ на период до 2030 г. : Распоряжение правительства РФ от 25.09.2017 № 2045. – URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71677266/> (дата обращения: 20.09.2022).
8. Pitout JD. Enterobacteriaceae that produce extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and AmpC  $\beta$ -lactamases in the community: the tip of the iceberg? *Curr Pharm Des.* 2012 Aug 29 // *Curr Pharm Des.* 2013. – No 19(2). – P. 257–63.
9. Раджабова, А. С. Микробиоценоз кишечника домашних собак и кошек при гастрите и колите / А. С. Раджабова // Стратегии и тренды развития науки в современных условиях. – 2017. – № 1 (3). – С. 32–35.
10. Dogs are a reservoir of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* lineages associated with human infections / Damborg P [et al.] // *Appl Environ Microbiol.* – 2009. – No 75. –P. 2360–2365.
11. Рабочая тетрадь для лабораторных занятий по дисциплине «Клиническая микробиология» / Сост. А. Л. Бурмистрова, Л. И. Бахарева, Н. Э. Хайдаршина. – Челябинск : Изд-во Челябинского государственного университета, 2021. – С. 8.
12. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: клинические рекомендации. – URL: <https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2018.pdf> (дата обращения: 20.09.2022).
13. Гостев, В. В. SCCmec кассеты, эволюция и генетические линии метилциллинрезистентных золотистых стафилококков / В. В. Гостев, С. В. Сидоренко. – URL: <https://www.antibiotics-chemotherapy.ru/jour/article/view/456/456> (дата обращения: 20.09.2022).
14. Коробова, А. Г. Мониторинг энтеробактерий с продукцией бета-лактамаз расширенного спектра, выделенных у больных гемобластозами при химиотерапии : специальность 14.01.21 «Гематология и переливание крови», 03.02.03 «Микробиология» : дис. ... канд. мед. наук / Коробова Анна Геннадьевна ; Национальный медицинский исследовательский центр гематологии. – Москва, 2018. – 109 с.
15. Шевченко, О. В. Металло- $\beta$ -лактамазы: значение и методы выявления у грамотрицательных неферментирующих бактерий / О. В. Шевченко, М. В. Эйдельштейн, М. Н. Степанова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2007. – Т. 9, № 3. – С.197–288.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Information Supplement. CLSI document M100-S23. – 2013. – P. 53–56.
17. Проведение ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени при помощи системы детекции продуктов ПЦР в режиме реального времени «iCycler iQ5» (BioRad): руководство пользователя.
18. Ausvet. EpiTools epidemiological calculators. 2018. – URL: <http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=CIPproportion> (дата обращения: 15.11.2018).
19. Hammer, O. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis / O. Hammer, D. A. T. Harper, P. D. Ryan // *Palaeontologia Electronica.* – 2001. – No 1. – P. 1–9.

## References

1. Resistance of microorganisms to antibiotics: resistome, its volume, diversity and development / K. A. Vinogradova, V. G. Bulgakov, A. N. Polin, P. A. Kogevin // *Antibiotics and chemotherapy.* – 2013. – Т. 58, No. 5–6. – P. 38–48.
2. Sidorenko, S. V. Mechanisms of resistance of microorganisms / S. V. Sidorenko, M. V. Eidelstein // *Practical guide to anti-infective chemotherapy.* – Smolensk : МАСМАН, 2007. – P. 19–32.
3. Martinez, J. L. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria // *Proc Biol Sci.* – 2009. – Vol. 276, № 1667. – P. 2521–2530. – DOI: 10.1098/rspb.2009.0320.
4. Chait, R. What counters antibiotic resistance in nature? / R. Chait, K. Vetsigian, R. Kishony // *Nature Chem. Biol.* – 2012. – Vol. 8, No 1. – P. 2–5. – DOI 10.1038/nchembio.745.
5. WHO global strategy to contain antimicrobial resistance. – URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/66872?locale-attribute=en&mode=full/> (accessed 09/20/2022).
6. Combating antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe. – URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/326399/> (accessed 20.09.2022).
7. Strategy for preventing the spread of antimicrobial resistance in the Russian Federation for the period up to 2030: Decree of the Government of the Russian Federation of September 25, 2017 No 2045. – URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71677266/> (date of access: 20.09.2022).

8. Pitout JD. Enterobacteriaceae that produce extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and AmpC  $\beta$ -lactamases in the community: the tip of the iceberg? *Curr Pharm Des.* 2012 Aug 29 // *Curr Pharm Des.* 2013. – No 19 (2). – P. 257–63.
9. Radzhabova A.S. Intestinal microbiocenosis of domestic dogs and cats with gastritis and colitis / A. S. Radjabova // *Strategies and trends in the development of science in modern conditions.* – 2017. – No 1 (3). – P. 32–35.
10. Dogs are a reservoir of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* lineages associated with human infections / Damborg P [et al.] // *Appl Environ Microbiol.* – 2009. – No 75. –P. 2360–2365
11. Workbook for laboratory studies in the discipline «Clinical Microbiology» / Comp. A. L. Burmistrova, L. I. Bakhareva, N. E. Khaidarshina. – Chelyabinsk : Publishing house of the Chelyabinsk State University, 2021. – P. 8.
12. Determination of the sensitivity of microorganisms to antimicrobial drugs: clinical guidelines. URL : <https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2018.pdf> (date of access: 20.09.2022).
13. Gostev, V. V. SCCmec cassettes, evolution and genetic lines of methylcillin-resistant *Staphylococcus aureus* / V. V. Gostev, S. V. Sidorenko. – URL: <https://www.antibiotics-chemotherapy.ru/jour/article/view/456/456> (date of access: 20.09.2022).
14. Korobova, A. G. Monitoring of enterobacteria with the production of extended-spectrum beta-lactamases isolated from patients with hemoblastoses during chemotherapy : specialty 14.01.21 «Hematology and blood transfusion», 03.02.03 «Microbiology» : dissertation for the degree of Candidate of Medical Sciences / Korobova Anna Gennadievna ; National Medical Research Center for Hematology. – Moscow, 2018. – 109 p.
15. Shevchenko, O. V. Metallo- $\beta$ -lactamases: significance and methods of detection in gram-negative non-fermenting bacteria / O. V. Shevchenko, M. V. Eidelstein, M. N. Stepanova // *Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy.* – 2007. – Vol. 9, No 3. – P. 197–288.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Information Supplement. CLSI document M100-S23. – 2013. – P. 53–56.
17. Conducting PCR with real-time result detection using the iCycler iQ5 real-time PCR product detection system (BioRad): user manual.
18. Ausvet. EpiTools epidemiological calculators. 2018. – URL: <http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=CIPProportion> (дата обращения: 15.11.2018).
19. Hammer, O. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis / O. Hammer, D. A. T. Harper, P. D. Ryan // *Palaeontologia Electronica.* – 2001. – No 1. – P. 1–9.

Ветеринарный врач. 2023. № 2. С. 55 – 59.  
The Veterinarian. 2023; (2): 55 – 59

Научная статья  
УДК 544.542;579.23  
DOI: 10.33632/1998-698X\_2023\_2\_55

### **Морфометрическая оценка ультраструктурной организации бактерий *Escherichia coli* после воздействия гамма-излучения**

Марина Юрьевна Галлямова, Константин Николаевич Вагин, Айдар Фаритович Махмутов, Глеб Сергеевич Кашеваров, Вадим Расимович Сайтов

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», Казань, Россия  
Автор, ответственный за переписку: Марина Юрьевна Галлямова, marina\_rb@inbox.ru

**Аннотация.** Изучение ответной реакции микроорганизмов на влияние различных факторов окружающей среды представляет собой объект постоянного внимания ученых. Бактерии подвержены воздействиям агентов, вызывающим изменения химико-физических и биохимических процессах, а в последующем в морфологии и структурной организации клеток. Цель работы состояла в общей морфометрической оценке влияния радиационного фактора на субмикроскопическую организацию *Escherichia coli*. Эксперимент выполнен на культуре клеток производственного штамма *E. coli* «ПЛ-6», радиационное воздействие было проведено с использованием стационарной гамма-установки «Исследователь» ( $^{60}\text{Co}$ ). Фиксацию культуры осуществляли 1 % раствором глутарового альдегида на фосфатном буфере. Далее образцы подвергали постфиксации тетраоксидом осмия, дегидратации (этиловые спирты восходящей концентрации – 30; 50; 70; 80; 96 %, абсолютные спирты, ацетон) и импрегнации. Материал в виде ультратонких срезов просматривали на электронном микроскопе Jeol JEM-1011 (Япония), полученные методом случайных бесповторных полей микрофотографии подвергали морфометрическому анализу в программе ImageJ (сборка FIJI). Статистическую обработку данных осуществляли в программах Statistica 6.0 и MS Excel. Выявлено, что влияние ионизирующего излучения внешне проявляется присутствием большего количества клеток *E. coli* с увеличенным периплазматическим пространством, а также меньшим количеством вытянутых форм. Общая морфологическая картина бактерий контрольной группы представлена разнообразными формами в большей степени, в том числе вытянутыми (полиморфность); преимущественно клетками с увеличенным периплазматическим пространством; придатков клеточной стенки (таких, как пили) не отмечено; везикулообразование почти не наблюдается. У бактерий опытной группы полиморфность менее выражена; удлинённые бактерии почти не встречаются; придатки клеточной стенки (такие, как пили) не отмечаются и везикулообразование крайне незначительно.

**Ключевые слова:** бактерии, ионизирующее излучение, кишечная палочка, морфометрия, ультраструктура

### **Morphometric assessment of ultrastructural organization *Escherichia coli* bacteria after exposure to gamma radiation**

Marina Yu. Gallyamova, Konstantin N. Vagin, Aidar F. Makhmutov, Gleb S. Kashevarov, Vadim R. Saitov

Federal State Budgetary Scientific Institution «Federal Center for toxicological, radiation, and biological safety», Kazan, Russia  
Corresponding author: Marina Yu. Gallyamova, marina\_rb@inbox.ru

**Abstract.** The study of the response of microorganisms to the influence of various environmental factors is an object of constant attention of scientists. Bacteria are exposed to agents that cause changes in the chemical-physical and biochemical processes, and subsequently in the morphology and structural organization of cells. The aim of the work was to assess the overall effect of the radiation factor on the submicroscopic organization of *Escherichia coli*. The experiment was performed on a cell culture of the production strain of *E. coli* «PL-6», radiation exposure was carried out using a stationary gamma installation «Researcher» ( $^{60}\text{Co}$ ).

The culture was fixed with a 1 % solution of glutaraldehyde in phosphate buffer. Further, the samples were subjected to post-fixation with osmium tetroxide, dehydration (ethyl alcohols of increasing concentration – 30; 50; 70; 80; 96 %, absolute alcohols, acetone) and impregnation. The material in the form of ultrathin sections was examined on a Jeol JEM-1011 electron microscope (Japan); Statistical data processing was carried out using the Statistica 6.0 and MS Excel programs. It was revealed that the influence of ionizing radiation is externally manifested by the presence of a larger number of *E. coli* cells with an increased periplasmic space, as well as a smaller number of elongated forms. The general morphological picture of bacteria in the control group is represented by various forms to a greater extent, including elongated ones (polymorphism); predominantly cells with increased periplasmic space; cell wall appendages (such as pili) were not noted; vesicle formation is almost not observed. In bacteria of the experimental group, polymorphism is less pronounced; elongated bacteria are almost never found; cell wall appendages (such as pili) are not seen and vesicle formation is extremely low.

**Keywords:** bacteria, ionizing radiation, *Escherichia coli*, morphometry, ultrastructure

**Введение.** Ионизирующее излучение (ИИ) представляет собой вид энергии, освобождаемой атомами в виде электромагнитных волн (гамма- или рентгеновское излучение) либо частиц (нейтроны, бета или альфа). Поглощение энергии излучения живыми организмами приводит к сложным биофизическим и биохимическим процессам. Так как основную часть массы тела у млекопитающих (и человека, в том числе) составляет вода, то действие ИИ, прежде всего, распространяется на воду и водные растворы [1].

Электронная микроскопия представляет собой высокотехнологичный метод изучения структур на наноуровне. Разрешающая способность указанного метода позволяет рассматривать и анализировать морфологию бактериальных клеток, поверхностных структур и образований [2].

Широко известно, что микроорганизмы являются самыми адаптивными из всех представителей живого мира. Смена условий окружающей среды способствует мобилизации всех возможностей микробных популяций для развития клеточной адаптивной реакции. В литературе имеется большое количество различных исследований, посвященных изучению влияния разнообразных стресс-факторов на микроорганизмы [3-10].

В связи с вышеизложенным, целью работы явилось проведение общей морфометрической оценки влияния радиационного фактора на субмикроскопическую организацию штамма, выбранного в качестве объекта исследований.

**Материалы и методы.** Работа выполнена в лаборатории радиационного контроля и техники, лаборатории бактериальных патологий животных и секторе ультраструктурных исследований ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». В качестве объекта исследований в проведенном эксперименте был выбран производственный штамм *E. coli* «ПЛ-6». Радиационное воздействие на культуру клеток осуществляли при помощи стационарной гамма-установки «Исследователь» (источник излучения  $^{60}\text{Co}$ ) с суммарной мощностью экспозиционной дозы 36,7 Гр/мин в дозах от 3,5 до 10 кГр с шагом в 0,5 кГр (13 циклов облучения), от дозы 10 до 30 кГр с шагом в 5 кГр (5 циклов облучения). По итогу было проведено 18 серий облучения культуры. После облучения производили посев на питательную среду Эндо, культивировали 18 ч в условиях термостата при температуре 37 °С. Также параллельно выполняли посев и культивирование контроля с каждым циклом облучения. После культивирования посева получали бактериальную массу методом смыва стерильным физиологическим раствором с поверхности плотной питательной среды. Для изучения ультраструктуры был выбран крайний вариант радиомодифицированных бактерий, сохраняющий свою жизнеспособность при облучении в дозе 30 кГр. Сравнение осуществляли с контрольной (без облучения) культурой. Смыв центрифугировали при 8 тыс. оборотов в минуту. Промытый и отцентрифугированный осадок культуры фиксировали по классической методике подготовки материала: в эппендорфах с 1 % раствором глутарового альдегида на фосфатном буфере. Далее проводили постфиксацию тетраоксидом осмия, дегидратацию (этиловые спирты восходящей концентрации – 30; 50; 70; 80; 96 %, абсолютные спирты, ацетон) и импрегнацию (пропитка образцов смесью эпоновых смол с последующей полимеризацией). Образцы были подготовлены для ультраструктурного анализа по методике ультратонких срезов. Срезы с эпоновых блоков готовили с использованием микротомы ЛКВ-III, после чего монтировали на блендах с полимерной подложкой и контрастировали солями тяжёлых металлов (уранилацетат, цитрат свинца).

Материал просматривали на электронном микроскопе Jeol JEM-1011, полученные методом случайных бесповторных полей микрофотографии подвергали морфометрическому анализу в программе ImageJ (сборка FII). Статистическую обработку данных осуществляли в программах Statistica 6.0 и MS Excel. Парное сравнение выборок проводилось с использованием теста Манна-



Уитни с исходным уровнем значимости  $\alpha = 0,05$  и последующей коррекцией уровня значимости по методу Бенджамини-Хохберга (контроль частоты ложноположительных результатов).

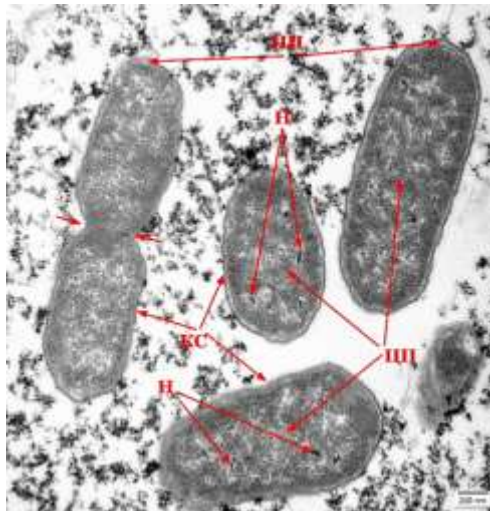
**Результаты и обсуждение.** Форма бактериальных клеток *E. coli* на ультратонких срезах округлая, овальная и палочковидная (в связи с различным положением клеток относительно плоскости прохождения среза). Электронограммы демонстрируют извилистую многослойную клеточную стенку, которая является характерной для грамотрицательных бактериальных клеток. Ультраструктура цитоплазмы нативных бактерий характеризуется высокой электронной плотностью с заполнением гранулярным компонентом – рибосомами, полирибосомами. Область нуклеоида не всегда визуализируется.

Воздействие ионизирующего излучения внешне проявляется присутствием большого количества клеток *E. coli* с увеличенным периплазматическим пространством, а также меньшим количеством вытянутых форм. Общая морфологическая картина бактерий контрольной группы представлена разнообразными формами в большей степени, в том числе вытянутыми (полиморфность); преимущественно клетками с увеличенным периплазматическим пространством; придатков клеточной стенки (таких, как пили) не отмечено; везикулообразование почти не наблюдается. У бактерий опытной группы полиморфность менее выражена; удлинённые бактерии почти не встречаются; придатки клеточной стенки (такие, как пили) не отмечаются и везикулообразование крайне незначительно. Морфометрические показатели клеток *E. coli* до и после облучения представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Морфометрические показатели клеток *E. coli* до и после облучения

Группа бактерий	Площадь	Периметр	Длина	Ширина
Контроль	0,72(0,46) $\mu\text{m}^2$	3,31(1,47) $\mu\text{m}$	1,33(0,74) $\mu\text{m}$	0,67(0,1) $\mu\text{m}$
Опыт	0,58(0,26) $\mu\text{m}^2$	2,87(0,8), $\mu\text{m}$	1,11(0,39) $\mu\text{m}$	0,66(0,11) $\mu\text{m}$

Бактерии контрольной группы представлены разнообразными: округлыми, овальными и вытянутыми (в том числе с перетяжками) формами (полиморфность). У большинства бактерий клеточная стенка имеет структуру, характерную для грамотрицательных форм, внешне без повреждений; ультраструктура цитоплазмы многих клеток характеризуется высокой электронной плотностью с заполнением гранулярным компонентом – рибосомами, полирибосомами. Вместе с тем встречаются клетки с увеличенным периплазматическим пространством, электронно-светлой цитоплазмой и фрагментами нитей нуклеоида. У незначительного количества клеток отмечается разрушение клеточной стенки (рисунок 1).

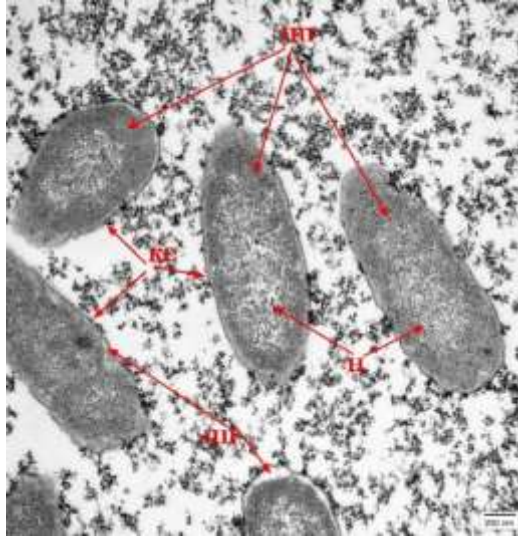


КС – клеточная стенка; ЦП – цитоплазма; ПП – периплазматическое пространство; Н – нуклеоид. Короткими стрелками указана перемычка места деления клетки

Рисунок 1 – Фрагмент среза культуры *E. coli* контрольной группы

У бактерий опытной группы главным образом присутствуют округлые и овальные формы, палочковидных форм мало, удлинённые почти не встречаются. У большинства бактерий клеточная стенка имеет структуру, характерную для грамотрицательных форм, внешне без повреждений.

Ультраструктура цитоплазмы многих бактерий имеет достаточно высокую электронную плотность. На этом фоне в незначительном количестве все же встречаются клетки с цитоплазмой, имеющей электронно-светлые участки, с видимыми нитями нуклеоида и увеличенным периплазматическим пространством. Иногда встречаются клетки с поврежденной клеточной стенкой (рисунок 2).



КС – клеточная стенка; ЦП – цитоплазма; ПП – периплазматическое пространство; Н – нуклеоид

Рисунок 2 – Фрагмент среза культуры *E. coli* опытной группы

Проведенный морфометрический анализ показывает, что в данном эксперименте воздействие ионизирующего излучения характеризуется изменением размеров бактериальных клеток в направлении их уменьшения.

**Заключение.** Проведенным исследованием воздействия ионизирующего излучения на ультраструктурную организацию *E. coli* выявлено, что бактериальные клетки на ультратонких срезах округлой, овальной и палочковидной формы (в связи с различным положением клеток относительно плоскости прохождения среза). Электронограммы демонстрируют извилистую многослойную клеточную стенку, характерную для грамотрицательных бактериальных клеток. Ультраструктура цитоплазмы нативных бактерий характеризуется высокой электронной плотностью с заполнением гранулярным компонентом – рибосомами, полирибосомами. Область нуклеоида не всегда визуализируется. Воздействие ионизирующего излучения внешне проявляется присутствием большего количества клеток *E. coli* с увеличенным периплазматическим пространством, а также меньшим количеством вытянутых форм.

**Благодарности:** авторы выражают благодарность доктору ветеринарных наук, профессору Низамову Рамзи Низамовичу, доктору биологических наук Спиридонову Геннадию Николаевичу и кандидату биологических наук Яруллину Айнуру Ильнуровичу за оказанную методическую помощь в проведении работы.

### Литература

1. Lagoda, P. J. L. Effects of radiation on living cells and plants // Plant mutation breeding and biotechnology. – Wallingford UK : CABI, 2012. – P. 123–134.
2. Морфофункциональные особенности высокочувствительных к дезинфицирующим средствам бактерий *Escherichia coli* K-12 при воздействии дезинфицирующего средства «Тотус» / В. Н. Герасимов, А. Е. Конев, Н. Б. Роганова [и др.] // Бактериология. – 2017. – Т. 2, № 2. – С. 59–65. – DOI 10.20953/2500-1027-2017-2-59-65.
3. Воздействие хитозана на ультраструктуру клеток патогенных и условно-патогенных микроорганизмов / В. М. Бондаренко, О. В. Рыбальченко, Н. Б. Вербицкая, С. Ф. Антонов. – URI: <http://hdl.handle.net/123456789/2451> (дата обращения: 23.01.2023).
4. Фенотипическая изменчивость *E. coli*, индуцированная  $\gamma$ -лучами  $^{60}\text{Co}$  / М. Ю. Галлямова, К. Н. Вагин, Р. Н. Низамов [и др.] // Ветеринарный врач. – 2021. – № 3. – С. 19–23. – DOI 10.33632/1998-698X.2021-3-19-23.

5. Анализ изменчивости генома облученной *E. coli* / М. Ю. Галлямова, Н. И. Хаммадов, К. Н. Вагин, Г. И. Рахматуллина // Генетические и радиационные технологии в сельском хозяйстве : сборник докладов I Международной молодежной конференции, 18-21 октября 2022 г. – Обнинск : ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии», 2022. – С. 122–125.
6. Еспембетов, Б. А. Электронная микроскопия микобактериофагов / Б. А. Еспембетов, Н. С. Сырым, В. Л. Зайцев [и др.] // Издестер, нетижелер. – 2018. – №. 1 (77). – С. 380–387.
7. Изучение изменения ультрамикроструктуры клеток *Escherichia coli* под влиянием Cry-белков параспоральных кристаллов *Bacillus thuringiensis* с помощью электронной микроскопии / Е. Г. Климентова, Т. Г. Юдина, Л. К. Каменек [и др.] // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2015. – №. 3. – С. 90–94.
8. Особенности ультраструктурной организации бактерий *Brucella melitensis* при воздействии гамма-лучей: морфометрический аспект / М. А. Косарев, М. М. Сальникова, Г. С. Кашеваров [и др.] // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2022. – № 9(215). – С. 76–83. – DOI 10.53083/1996-4277-2022-215-9-76-83.
9. Муртазина, Г. Х. Электронно-микроскопические исследования антибактериального эффекта селимакцида в отношении сальмонелл и эшерихий / Г. Х. Муртазина, М. М. Сальникова // Казанский медицинский журнал. – 2016. – Т. 97, №. 1. – С. 77–83.
10. Морфометрическая оценка особенностей влияния селимакцида на ультраструктурную организацию клеток *Escherichia coli* и *Salmonella enteritidis* / М. М. Сальникова, Р. М. Потехина, В. Р. Сайтов [и др.] // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2022. – №. 11 (188). – С. 84–91.

#### References:

1. Lagoda, P. J. L. Effects of radiation on living cells and plants // Plant mutation breeding and biotechnology. – Wallingford UK : CABI, 2012. – P. 123–134.
2. Morphofunctional features of *Escherichia coli* K-12 bacteria highly sensitive to disinfectants under the influence of the disinfectant "Totus" / V. N. Gerasimov, A. E. Konev, N. B. Roganova [et al.] // Bacteriology. – 2017. – V. 2, No 2. – P. 59–65. – DOI 10.20953/2500-1027-2017-2-59-65.
3. Effect of chitosan on the cell ultrastructure of pathogenic and opportunistic microorganisms / V. M. Bondarenko, O. V. Rybalchenko, N. B. Verbitskaya, S. F. Antonov. – URI: <http://hdl.handle.net/123456789/2451> (date of access: 01/23/2023).
4. Phenotypic variability of *E. coli* induced by  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -rays / M. Yu. Galliamova, K. N. Vagin, R. N. Nizamov [et al.] // Veterinarian. – 2021. – No 3. – P. 19–23. – DOI 10.33632/1998-698X.2021-3-19-23.
5. Analysis of variability of the genome of irradiated *E. coli* / M. Yu. Galliamova, N. I. Hammadov, K. N. Vagin, G. I. Rakhmatullina // Genetic and radiation technologies in agriculture: collection of reports of the I International Youth Conference, October 18-21, 2022 – Obninsk: All-Russian Research Institute of Radiology and Agroecology, 2022. – P. 122–125.
6. Espembetov, B. A. Electron microscopy of mycobacteriophages / B. A. Espembetov, N. S. Syrym, V. L. Zaitsev [et al.] // Izdenister, netizheler. – 2018. – No 1 (77). – P. 380–387.
7. Study of changes in the ultramicrostructure of *Escherichia coli* cells under the influence of Cry-proteins of parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* using electron microscopy / E. G. Klimentova, T. G. Yudina, L. K. Kamenek [et al.] // Ulyanovsk Biomedical magazine. – 2015. – No. 3. – P. 90–94.
8. Features of the ultrastructural organization of bacteria *Brucella melitensis* under the influence of gamma rays: morphometric aspect / M. A. Kosarev, M. M. Salnikova, G. S. Kashevarov [et al.] // Bulletin of the Altai State Agrarian University. – 2022. – No 9 (215). – P. 76–83. – DOI 10.53083/1996-4277-2022-215-9-76-83.
9. Murtazina, G. Kh. Electron microscopic studies of the antibacterial effect of selimaccid against *Salmonella* and *Escherichia* / G. Kh. Murtazina, M. M. Salnikova // Kazan Medical Journal. – 2016. – Т. 97, No 1. – P. 77–83.
10. Morphometric evaluation of the features of the effect of selimaccid on the ultrastructural organization of *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* cells / M. M. Salnikova, R. M. Potekhina, V. R. Saitov [et al.] // Bulletin of the Krasnoyarsk State Agrarian University. – 2022. – No 11 (188). – P. 84–91.

Ветеринарный врач. 2023. № 2. С. 60 – 69.  
The Veterinarian. 2023; (2): 60 – 69

Научная статья  
УДК 619:615.849:579:621.396.96  
DOI: 10.33632/1998-698X\_2023\_2\_60

### **Влияние комбинированного действия микотоксинов и ионизирующего излучения на аллергическую сенсibilизацию**

Эдуард Ильясович Семёнов, Наиля Наримановна Мишина, Алмаз Рафаильевич Валиев, Лилия Евгеньевна Матросова, Константин Николаевич Вагин, Николай Михайлович Василевский

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», Казань, Россия

Автор, ответственный за переписку: Эдуард Ильясович Семёнов, [semyonovei@bk.ru](mailto:semyonovei@bk.ru)

**Аннотация.** Ионизирующее излучение может иметь различные биологические эффекты в зависимости от дозы и её мощности. Низкодозовое гамма-облучение всего тела активизирует иммунные реакции различными путями, но влияние и механизм низких доз облучения на аллергические реакции остаются плохо изученными. Также малоизученным остается механизм аллергической сенсibilизации к пищевым аллергенам. В этой связи все более актуальным является изучение множественной химической чувствительности, представляющая собой мультисистемное, рецидивирующее расстройство, которое обостряется в ответ на различные воздействия (например, пестициды, растворители, токсичные металлы и плесень) ниже порогового предельного значения, рассчитанного для возраста и пола.

Проведено исследование возможности действия ионизирующего излучения и микотоксинов (Т-2 токсин, дезоксиниваленон, зеараленон) как факторов-индукторов аллергической сенсibilизации. Изучение проводили на белых крысах линии Вистар. В качестве модельного аллергена использовали овальбумин. Моделирование подострой лучевой болезни проводили однократной дозой 4,0 Гр с мощностью экспозиционной дозы 5,38 Р/мин. Дозировки микотоксинов были на уровне ПДК, животные их потребляли в течение 10 суток

Установили, что потребление микотоксинов усиливало проявление анафилактического шока у животных, воздействие ионизирующим излучением, напротив, уменьшало его. Эти же тенденции сохранялись в динамике титров антител к овальбумину. Комбинированное воздействие вызывало незначительное превышение данных параметров относительно контроля. Комбинированное действие вызывало значительное увеличение проницаемости кишечника, что приводило к накоплению микотоксинов в печени. Обнаружен эффект последствия и отсроченного эффекта.

Несмотря на то, что не регистрировали усиление сенсibilизации немедленного типа при комбинированном воздействии ионизирующего излучения и микотоксинов, сохраняется риск, что сочетание воздействия ионизирующего излучения и особенностей питания/кормления может способствовать дополнительному повреждению организма. Потребление продуктов, содержащих высокие уровни микотоксинов, которые индуцируют определенные нарушения, как у людей, так и у животных, вызывает значительный риск для здоровья. Обнаруженный нами эффект последствия требует дополнительных исследований в реакции гиперчувствительности замедленного типа.

**Ключевые слова:** ионизирующее излучение, микотоксины, Т-2 токсин, зеараленон, дезоксиниваленон, аллергия, сенсibilизация немедленного типа

### **Influence of the combined action of mycotoxins and ionizing radiation on allergic sensitization**

Eduard I. Semenov, Nailya N. Mishina, Almaz R. Valiev, Lilia E. Matrosova, Konstantin N. Vagin, Nikolai M. Vasilevski

Federal State Budgetary Scientific Institution «Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological safety», Kazan, Russia

Corresponding author: Eduard Ilyasovich Semenov, [semyonovei@bk.ru](mailto:semyonovei@bk.ru)

**Abstract.** Ionizing radiation can have different biological effects depending on the dose and its power. Whole-body low-dose gamma irradiation activates immune responses in a variety of ways, but the effect and mechanism of low-dose irradiation on allergic responses remains poorly understood. The mechanism of allergic sensitization to food allergens also remains poorly understood. In this regard, the study of multiple chemical sensitivity, which is a multisystemic, relapsing disorder, that aggravates in response to various exposures (for example, pesticides, solvents, toxic metals, and mold) below a threshold calculated for age and sex, is of increasing relevance.

A study of the possibility of the action of ionizing radiation and mycotoxins (T-2 toxin, deoxynivalenol, zearalenone) as factors - inducers of allergic sensitization was made. The study was carried out on white Wistar rats. Ovalbumin was used as allergen model. Modeling of subacute radiation sickness was performed with a single dose of 4.0 Gy with an exposure dose rate of 5.38 R/min. The doses of mycotoxins were at the MPC level, the animals were exposed for 10 days.

It was established that the consumption of mycotoxins increased the manifestation of anaphylactic shock in animals, while exposure to ionizing radiation, on the contrary, reduced it. The same trends persisted in the dynamics of antibody titers to ovalbumin. The combined effect caused a slight excess of these parameters relative to the control. The combined action caused a significant increase in intestinal permeability, which led to the accumulation of mycotoxins in the liver. An aftereffect and a delayed effect have been found.

Although no immediate-type sensitization enhancements have been recorded when combined with ionizing radiation and mycotoxins, there is a risk that a combination of exposure to ionizing radiation and diet/feeding features may cause additional damage to the body. Consumption of food containing high levels of mycotoxins, which are associated with certain disorders in both humans and animals, poses significant health risks. The aftereffect we found requires additional studies in delayed-type hypersensitivity reactions.

**Keywords:** ionizing radiation, mycotoxins, T-2 toxin, zearalenone, deoxynivalenol, allergy, immediate-type sensitization

**Введение.** За последние десятилетия распространенность пищевой аллергии увеличилась до 6 % у детей и до 3 % у взрослых [1]. Поскольку методов лечения еще нет, лечение пищевой аллергии в первую очередь зависит от избегания контакта с аллергеном для предотвращения побочных реакций, вызванных пищей, у сенсibilизированных людей. Пищевая аллергия является результатом аномальных иммунологических реакций на пищевые антигены, приводящих к антиген-специфическим IgE-опосредованным реакциям с симптомами, варьирующими от легкого кожного зуда до тяжелой и потенциально опасной для жизни анафилаксии [2]. Несмотря на обширные исследования, механизм инициации аллергической сенсibilизации к пищевым антигенам остается малоизученным. В этой связи все более актуальным является изучение множественной химической чувствительности, которая представляет собой мультисистемное, рецидивирующее расстройство, обостряющееся в ответ на различные воздействия (например, пестициды, растворители, токсичные металлы и плесень) ниже порогового предельного значения, рассчитанного для возраста и пола среди населения в целом [3].

В большинстве моделей пищевой аллергии используется овальбумин. Его применяют для провоцирования аллергической сенсibilизации. Одним из важных механизмов, связанных с адьювантным эффектом белкового аллергена, является разрушение слоя эпителиальных клеток кишечника путем разрушения адгезивных молекул [4], а одним из проявлений реакции системной анафилаксии является увеличение проницаемости кишечника к высокомолекулярным соединениям [5] в результате разрушения слоя эпителиальных клеток кишечника путем разрушения адгезивных молекул. Это тесно согласуется с иммунологической концепцией, согласно которой для сенсibilизации требуется сигнал опасности, такой как повреждение ткани.

Уже известно, что в коже и легких нарушение эпителиального барьера может вызывать аллергическую сенсibilизацию. Например, протеолитическая активность аллергенов клещей домашней пыли разрушает сеть плотных контактов в эпителии легких. Это приводит к высвобождению эпителиальными клетками эндогенных сигналов опасности и цитокинов, за которой следует серия событий, приводящих к синтезу IgE В-клетками [6]. Также в коже умеренное повреждение эпителия сопровождается индукцией системного IgE. В этом случае поврежденные эпителиальные клетки кожи активируют стрессовые молекулы и алармины, такие как IL-25 и IL-33 [7].

Основываясь на этих выводах, предполагаем, что физические и химические вещества, вызывающие стресс или повреждение эпителиальных клеток, могут действовать как адьювант к потенциальным пищевым аллергенам.

Люди ежедневно подвергаются воздействию низких доз ионизирующего излучения [8], в том числе медицинского диагностического облучения, профессионального облучения и естественного фонового излучения, различными путями. Биологические эффекты ионизирующего излучения с

низкими дозами сильно отличаются от высоких доз ионизирующего излучения, но в настоящее время оцениваются путем экстраполяции эффектов высоких доз излучения линейной беспороговой модели [9]. Хотя использование этой модели за последнее несколько десятилетий прочно закрепилось во всем мире в нормах радиационной безопасности, научное сообщество продолжает спорить о целесообразности ее использования [10]. Поэтому многие международные организации заявили, что необходимо больше данных о воздействии низких доз ионизирующего излучения на молекулярном, клеточном, животном и человеческом уровнях [11].

Ионизирующее излучение может иметь различные биологические эффекты в зависимости от дозы и мощности дозы. В некоторых сообщениях утверждается, что радиация в малых дозах оказывает благоприятное воздействие, а радиация в высоких дозах вредна [12, 13, 14, 15]. Было показано, что низкодозовое гамма-облучение всего тела активирует иммунные реакции несколькими способами, но влияние и механизм низких доз облучения на аллергические реакции остаются плохо изученными.

Наиболее широко распространенными в мире являются микотоксины трихотеценовой группы, продуцируемые микроскопическими грибами рода *Fusarium*, из которых своими токсическими свойствами и высокой частотой обнаружения выделяется Т-2 токсин и дезоксиниваленол (ДОН) [16, 17, 18, 19, 20]. При этом нельзя исключать сочетанное воздействие различных токсинов [21, 22, 23, 24, 25]. В патогенезе заболевания микотоксикозом аллергические проявления также бывают клинически выражены, но в большей степени протекают латентно или на фоне других проявлений микотоксикоза остаются незамеченными [26]. При этом на фоне хронического воздействия микотоксинов происходят изменения в иммунной системе организма [27, 28].

Исследовали – может ли ионизирующее излучение и трихотеценовые микотоксины (Т-2 токсин и дезоксиниваленол (ДОН)), известные как биологически активные метаболиты, нарушающие барьерную функцию кишечника путем прямого воздействия на эпителиальные клетки кишечника [29], совместно с другими фузариотоксинами, такими как зеараленон, действовать как факторы-индукторы аллергической сенсibilизации.

**Материалы и методы.** В исследованиях использовали крыс-самцов линии Вистар с исходной массой 180-200 г. В течение 7 дней перед началом эксперимента животных содержали на стандартном рационе вивария, не содержащем яичного белка. Затем сформировали 4 группы крыс по 20 животных в каждой. Животные 1-й группы (биологический контроль, интактные животные) получали стандартный рацион вивария; животные 2-й группы (контрольная группа) получали в течение 10 суток стандартный рацион вивария с добавлением микотоксинов (Т-2 токсин, дезоксиниваленол и зеараленон в МДУ); животные 3-й группы получали стандартный рацион и в первый день исследования были подвергнуты однократно внешнему облучению ионизирующим излучением в дозе 4 Гр; животные 4-й группы получали стандартный рацион в течение 10 суток с добавлением микотоксинов (Т-2 токсин, дезоксиниваленол и зеараленон в МДУ), и дополнительно в первый день исследования были подвергнуты однократно внешнему облучению ионизирующим излучением в дозе 4 Гр.

Моделирование подострой лучевой болезни проводили на гамма-установке «Пума» с радиоактивным источником цезий-137 в дозе 4,0 Гр с мощностью экспозиционной дозы 5,38 Р/мин. Для исследований использовали Т-2 токсин, ДОН и зеараленон, предварительно полученные нами из зернового субстрата инокулированного токсигенными штаммами-продуцентами микроскопических грибов рода *Fusarium*. Экстракты фунгальных масс очищали колоночной хроматографией, токсины кристаллизовали, чистота полученных токсинов составила не менее 97,8 %.

Животные в группах были разделены на две подгруппы. Первая подгруппа животных во всех группах были сенсibilизированы модельным аллергеном (ОВА). Сенсibilизацию осуществляли согласно стандартной методике [30]: на 1-ый, 3-й, 5-й дни опыта животных внутрибрюшинно сенсibilизировали овальбумином (по 100 мкг) в объеме 0,2 мл на стерильном изотоническом растворе натрия хлорида; на 11-й день эксперимента для индукции реакции системной анафилаксии вводил «разрешающую» дозу раствора овальбумина – 3 мг/кг массы тела в 0,5 мл изотонического апиrogenного раствора натрия хлорида. Оценивали тяжесть системной анафилаксии. Для определения изменения проницаемости слизистой кишечника внутривентрикулярно вводили всем крысам полиэтиленгликоль ПЭГ 4000 (ПЭГ-4000) по 500 мг. У крыс отбирали кровь для определения уровня специфических антител на аллерген и содержание остаточных количеств ПЭГ-4000. У второй части животных проводили подобные же манипуляции, но начиная с 11 суток исследования, с целью изучения эффекта последствия комбинированного воздействия ионизирующего излучения и микотоксинов.

Интенсивность гуморального иммунного ответа оценивали по концентрации циркулирующих специфических IgG-антител к овальбумину в непрямом твердофазном иммуноферментном тесте [31]. Тяжесть системной анафилаксии у животных наблюдали в течение 30 минут и выражали в баллах в соответствии со следующей шкалой: отсутствие видимых изменений – 0 баллов, вялость – 2 балла, озноб – 3 балла, одышка – 4 балла, атаксия – 5 баллов, цианоз – 6 баллов, судороги – 7 баллов, парез задних конечностей – 8 баллов, паралич – 9 баллов, смертельный исход – 10 баллов. Исследования на животных были разрешены Локальным этическим комитетом ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности».

Концентрацию ПЭГ-4000 определяли в сыворотке рефрактометрическим детектированием [31], а величину всасывания выражали в процентах от внутрижелудочно введенной дозы. Содержание остаточных количеств микотоксина зеараленона в печени методом ИФА.

Для полученных результатов приводили значения средних (M) и стандартных ошибок среднего арифметического ( $\pm$ SEM), вычисленных в соответствии с формулой В.2.17 рекомендаций по выражению неопределённости [32]. Для оценки статистической значимости межгрупповых различий использовали тест Краскела–Уоллиса; критическим уровнем статистической значимости принимали  $p = 0,05$ . В случае обнаружения статистически значимых различий в тесте Краскела–Уоллиса апостериорно проводился тест Манна–Уитни.

**Результаты исследований.** Результаты оценки тяжести анафилаксии представлены на рисунке 1.

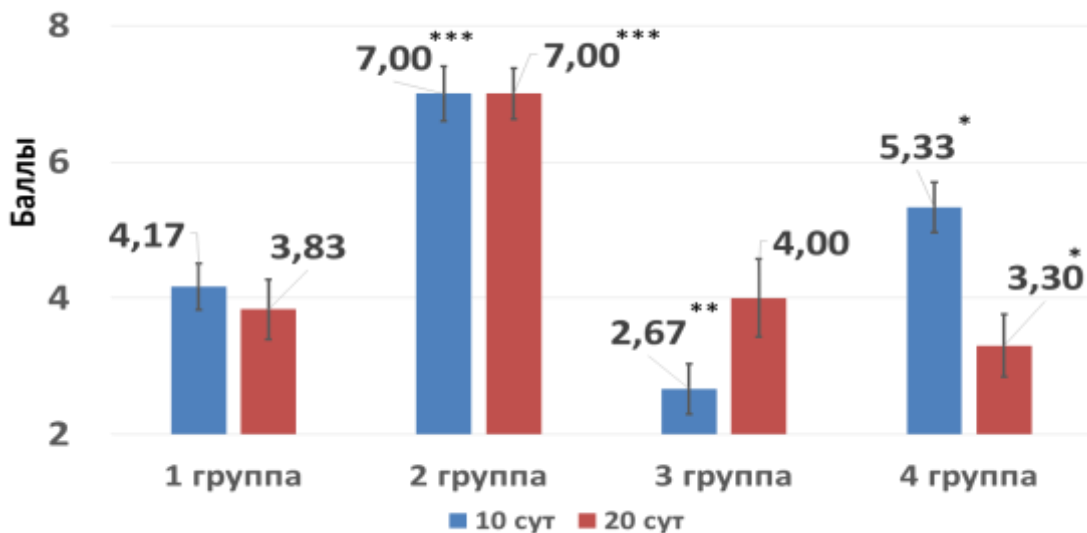


Рисунок 1 – Проявление анафилаксии у крыс, балл (M  $\pm$  m, n = 6)

Как следует из рисунка 1, комбинированное воздействие микотоксинов вызывало аллергическую сенсibilизацию на основе всех измеренных параметров. Это подтверждают наши более ранние исследования [26]. Так, потребление животными рациона, контаминированного микотоксинами, приводило к усилению тяжести анафилактической реакции (7,00 баллов) по сравнению с группой контроля (4,17 баллов) и животными, подвергшимися однократному воздействию ионизирующего излучения и совместному воздействию радиации и микотоксинов (5,33 баллов). Напротив, в группе облученных животных проявление анафилактического шока было менее выражено, даже по сравнению с группой контроля. Причем в первые 10 суток после облучения эта тенденция была более выражена (2,67 баллов), а на 20 сутки данный эффект нивелировался и был на уровне контрольной группы (4,00 балла). В группе комбинированного воздействия наблюдался парадоксальный эффект – в первой половине эксперимента анафилаксия была статистически достоверно проявлена более выразительно (5,33 баллов), чем группа контроля, и это проявление носило усреднённый уровень между показателями второй и третьей группами. Этот эффект, учитывая выявленное антагонистическое влияние ионизирующего излучения, вполне объясним. Но проявление анафилаксии у крыс было ниже, чем во второй и третьей группах. Результаты изучения содержания ПЭГ-4000 представлены на рисунке 2.

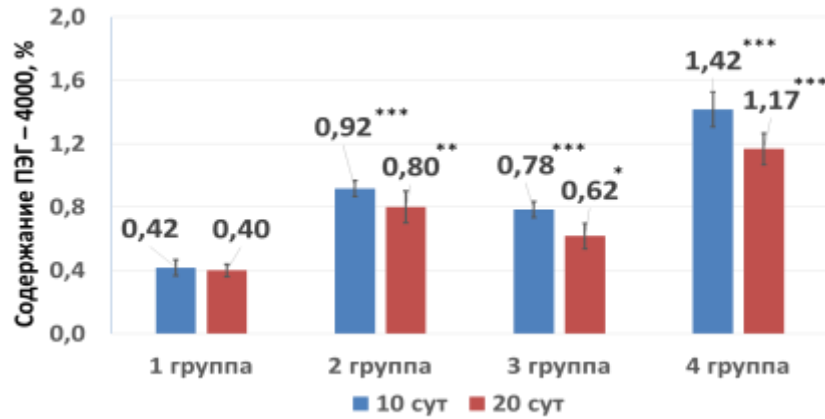


Рисунок 2 – Содержание ПЭГ-4000, процент от введенной дозы ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

Как следует из рисунка 2, контаминация рациона микотоксинами вызывала двукратное и более усиление проницаемости кишечника. ДОН и Т-2 токсин изменяют проницаемость эпителия, что приводит к транслокации аллергена в результате изменений в функции и экспрессии белков, и нарушению трансэпителиального электрического сопротивления (TEER) монослоев [29]. Воздействие ионизирующей радиации также повышало проницаемость эпителия кишечника, что согласуется с данными описанными в [11]. Комбинированное воздействие 3-4 кратно увеличивало проницаемость кишечника. Как одно из проявлений аллергической сенсibilизации немедленного типа (по типу анафилаксии) является увеличение проницаемости эпителия кишечника, что мы и наблюдали в первой группе. Усиление проницаемости в остальных группах связано не только с алергизацией, но и с непосредственным воздействием самих изучаемых факторов, причем прослеживается эффект последствия. Однако усиление проницаемости в результате воздействия радиации не совпадало с яркостью проявления анафилаксии, что свидетельствует об особенностях иммунологических реакций организма животных. Результаты изучения титра антител к овалбумину представлены на рисунке 3.

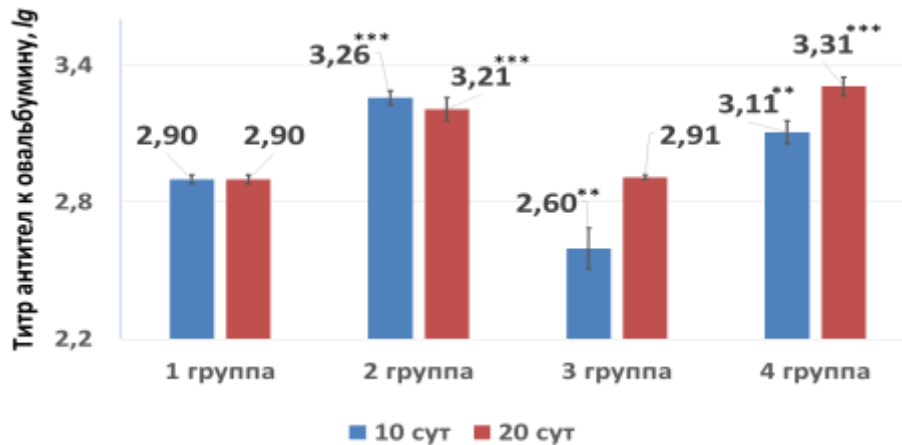


Рисунок 3 – Титр антител к овалбумину, lg ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

Как следует из рисунка 3, титр антител к модельному аллергену – овалбумину, был выше во второй и четвертой группах крыс и ниже в третьей группе. Эти данные и выявленные тенденции совпадают с проявлениями анафилактического шока. Результаты изучения титра антител к овалбумину представлены на рисунке 4.



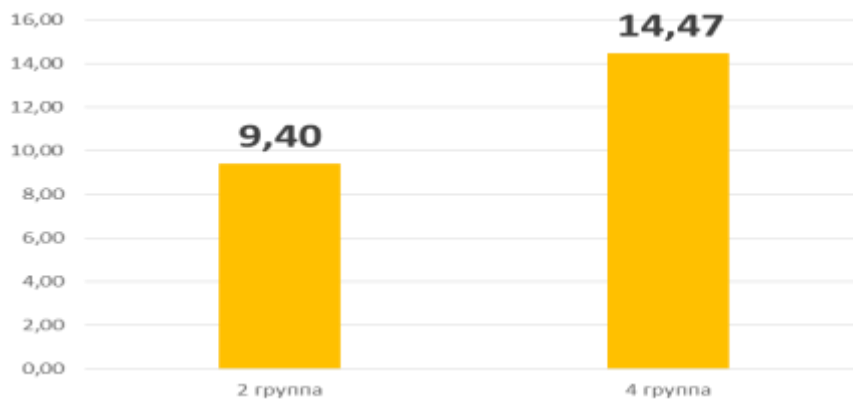


Рисунок 4 – Титр антител к овальбумину, lg ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

Как следует из рисунка 4, содержание микотоксина зеараленона в печени в четвертой группе выше, чем во второй. Вероятно, это связано с увеличением проницаемости кишечника, а также, возможно, со снижением обезвреживающей способности печени в результате воздействия ионизирующей радиации и микотоксинов. Ионизирующее излучение является стрессовым фактором, который может вызвать повреждение клеток. Ионизирующее излучение действует прямо или косвенно через радиолит воды, тем самым создавая активные окислительные частицы (АФК). АФК могут атаковать нуклеиновые кислоты, что сопровождается множеством различных типов повреждений ДНК. Повреждения ДНК могут возникать в результате воздействия кислородных радикалов, образующихся в ходе эндогенного процесса, а также из производственной и бытовой среды. Одним из механизмов действия микотоксинов также является процесс перекисного окисления липидов. Некоторые авторы считают, что трихотеценовые микотоксины обладают радиомиметическим действием.

Рассматривая механизмы алергизации организма, в частности по немедленному типу, необходимо отметить, что аллергены распознаются антителами IgE на поверхности тучных клеток [33]. После этого узнавания клетки высвобождают как предварительно сформированные, так и вновь синтезированные медиаторы аллергической реакции [34]. Терапевтическое вмешательство при аллергических заболеваниях в основном направлено на блокирование этих реакций. В нашем исследовании выявили, что микотоксины усиливают проявление анафилаксии, но ионизирующее излучение, наоборот, ослабляет это проявление. Видимо, это объясняется тем, что низкие дозы ионизирующего излучения подавляют симптомы аллергии и ингибирует дегрануляцию и экспрессию воспалительных цитокинов в активированной системе тучных клеток [35]. В то же время действие радиации неоднозначно – ранее ряд авторов регистрировали радиоиндуцированную аллергию [36]. Чтобы предсказать влияние радиации на здоровье необходимо понимать, как клеточные реакции, возникающие в многоклеточном организме, интегрируются для получения системного ответа. Поэтому в этом исследовании мы изучили эффект ионизирующего излучения и микотоксинов на моделях крыс, поскольку целью этого исследования был анализ системы в целом, а не отдельные детали.

Таким образом, в этом исследовании мы предполагаем, что ионизирующее излучение может ингибировать аллергические реакции немедленного типа. До сих пор, поскольку лишь немногие исследователи тщательно изучали влияние ионизирующего излучения на аллергическую реакцию совместно с пищевыми аллергенами. Эти результаты системных исследований имеют большое значение. Хотя мы и не регистрировали усиление сенсibilизации при комбинированном воздействии ионизирующего излучения и микотоксинов, однако в сочетании с воздействием ионизирующего излучения и особенностями кормления могут способствовать дополнительному повреждению организма. Потребление продуктов, содержащих высокие уровни микотоксинов, которые связаны с определенными нарушениями, как у людей, так и у животных, вызывает значительный риск для здоровья. Это исследование показало, что случайное потребление микотоксинов способствует увеличению значений, исследуемых биомаркеров, подвергшихся воздействию ионизирующего излучения. Комбинированное воздействие ионизирующего излучения и микотоксинов требует продолжения исследования сенсibilизации замедленного типа с варьированием различных дозировок.

## Литература

1. Diagnosis and management of food allergies: new and emerging options: a systematic review / A.W. O'Keefe, S. De Schryver, J. Mill [et al.] // *J Asthma Allergy*. – 2014. – No 7. – P. 141–164. – DOI: 10.2147/JAA.S49277.
2. Berin, M. C. Food allergy: an enigmatic epidemic / M. C. Berin, H. A. Sampson // *Trends Immunol*. – 2013. – No 8. – P. 390-7. – DOI: 10.1016/j.it.2013.04.003.
3. Italian Expert Consensus on Clinical and Therapeutic Management of Multiple Chemical Sensitivity (MCS) / G. Damiani, M. Alessandrini, D. Caccamo [et al.] // *Int J Environ Res Public Health*. – 2021. – Vol. 18 (21). – P. 11294. – DOI: 10.3390/ijerph182111294.
4. Cholera toxin disrupts barrier function by inhibiting exocyst-mediated trafficking of host proteins to intestinal cell junctions / A. Guichard, B. Cruz-Moreno, B. Aguilar [et al.] // *Cell Host Microbe*. – 2013. – No 3. – P. 294–305. – DOI: 10.1016/j.chom.2013.08.001.
5. Intestinal uptake of macromolecules. VI. Uptake of protein antigen in vivo in normal rats and in rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis* or subjected to mild systemic anaphylaxis / K. J. Bloch, D.B. Bloch, M. Stearns [et al.] // *Gastroenterology*. – 1979. – No 5. – P. 1039-1044.
6. Lambrecht, B. N. The airway epithelium in asthma / B. N. Lambrecht, H. Hammad // *Nat Med*. – 2012. – No 5. – P. 684–692. – DOI: 10.1038/nm.2737.
7. The intraepithelial T cell response to NKG2D-ligands links lymphoid stress surveillance to atopy / J. Strid, O. Sobolev, B. Zafirova [et al.] // *Science*. – 2011. – No 2. – P. 1293–1297. – DOI: 10.1126/science.1211250.
8. Алексахин, Р. М. Ядерная энергия и биосфера / Р. М. Алексахин. – М. : Энергоиздат, 1982. – 215 с.
9. Review and evaluation of updated research on the health effects associated with low-dose ionising radiation / L. T. Dauer, A. L. Brooks, D. G. Hoel [et al.] // *Radiat Prot Dosimetry*. – 2010. – No 2. – P. 103–136. – DOI: 10.1093/rpd/ncq141.
10. Dose and dose-rate effects of ionizing radiation: a discussion in the light of radiological protection / W. Rühm, G. E. Woloschak, R. E. Shore [et al.] // *Environ Biophys*. – 2015. – No 4. – P. 379–401. – DOI: 10.1007/s00411-015-0613-6.
11. Organ-Specific Effects of Low Dose Radiation Exposure: A Comprehensive Review / E. Shin, S. Lee, H. Kang // *Front Genet*. – 2020. – No 2. – P. 566244. – DOI: 10.3389/fgene.2020.566244.
12. Doss, M. Linear No-Threshold Model VS. Radiation Hormesis / M. Doss // *Dose Response*. 2013. – No 4. – P. 480–497. – DOI: 10.2203/dose-response.13-005.Doss.
13. Радиозология и обеспечение радиационной безопасности / Н. И. Санжарова, С. В. Фесенко, А. В. Панов, Е. И. Карпенко // *История науки и техники*. – 2020. – № 7. – С. 58–72.
14. Стимулирующее действие малых доз радиации на организм : монография / Г. В. Конюхов, Р. Н. Низамов, Н. Б. Тарасова [и др.]. – Казань : ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», 2018. – 409 с.
15. Радиозащитный эффект препаратов микробного происхождения при острой лучевой болезни / Р. Н. Низамов, Н. М. Василевский, Р. Н. Низамов [и др.] // *Ветеринарный врач*. – 2021. – № 2. – С. 34–38.
16. Sato, N. Toxicological approaches to the toxic metabolites of *Fusaria* VIII: acute and subacute toxicities of T-2 toxin in cats / N. Sato, Y. Ueno, M. Enomoto // *Japan. J. Pharmacol*. – 1975. – No 25. – P. 263–270. – DOI: 10.1254/jjp.25.263.
17. Smith, T. K. Recent advances in the understanding of *Fusarium trichothecene* mycotoxicoses / T. K. Smith // *J Anim Sci*. – 1992. – No 12. – P. 3989–3993. – DOI: 10.2527/1992.70123989x.
18. Bergers, W. W. Dura EA, Stap JG. Changes in circulatory white blood cells of mice and rats due to acute trichothecene intoxication / W. W. Bergers, E. A. Dura, J. G. Stap // *Toxicol Lett*. – 1987. – No 2. – P. 173–179. – DOI: 10.1016/0378-4274(87)90182-2.
19. Валиев, А. Р. Иммуносупрессия в патогенезе T-2 микотоксикоза и её фармакокоррекция / А. Р. Валиев, Э. И. Семёнов, Ф. Г. Ахметов // *Ветеринарный врач*. – 2011. – № 2. – С. 4–6.
20. Баскова, Е. Ю. Применение энтеросорбентов на основе нанотехнологий для борьбы с микотоксикозами животных / Е. Ю. Баскова // *Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана*. – 2008. – Т. 192. – С. 234.
21. Мишина, Н. Н. Профилактическая эффективность лигнин- и полисахаридсодержащих энтеросорбентов при сочетанном T-2 и афлатоксикозе : специальность 16.00.04 «Ветеринарная

фармакология с токсикологией» : дис. ... канд. биол. наук / Мишина Наиля Наримановна. – Казань, 2008. – 162 с.

22. Efficiency of application of a polysaccharide enterosorbent of «Fitosorb» for prevention of the combined mycotoxicosis / E. I. Semenov, A. M. Tremasova, V. R. Saitov [et al.] // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. – 2016. – No 2. – P. 2229–2237.

23. Homeostatic system of sheep against the background of combined effects of pollutants and the use of therapeutic and preventive agents / K. K. Papunidi, I. R. Kadikov, V. R. Saitov [et al.] // *Bali Medical Journal*. – 2017. – No 2. – P. 83–87. – DOI: 10.15562/bmj.v6i2.523.

24. Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects / M. C. Smith, S. Madec, E. Coton [et al.] // *Toxins (Basel)*. – 2016. – No 4. – P. 94. – DOI: 10.3390/toxins8040094.

25. Комбинированные поражения животных и разработка средств профилактики и лечения: монография / К. Х. Папуниди, Г. В. Конюхов, Р. Н. Низамов [и др.]. – Казань : ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», 2019. – 248 с.

26. Семенов, Э. И. Неучтенная анафилактическая реакция на действие микотоксинов / Э. И. Семенов, Н. Н. Мишина, К. Х. Папуниди // *Medline.ru. Российский биомедицинский журнал*. – 2019. – Т. 20. – С. 36–43.

27. Bondy, G. S. Immunomodulation by fungal toxins / G. S. Bondy, J. J. Pestka // *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. – 2000. – No 2. – P. 109–143. – DOI: 10.1080/109374000281113.

28. Screening drugs-potential immunomodulators for T-2 mycotoxicosis / E. I. Semenov, N. N. Mishina, I. R. Kadikov [et al.] // *Bali Medical Journal* 2017. – No 2. – P. 110–114. – DOI: 10.15562/bmj.v6i2.516.

29. Deoxynivalenol: a trigger for intestinal integrity breakdown / P. Akbari, S. Braber, H. Gremmels [et al.] // *FASEB J*. – 2014. – No 6. – P. 2414–2429. – DOI: 10.1096/fj.13-238717.

30. Stokes, C. R Animal models of food sensitivity / C. R. Stokes, B. G. Miller, F. J. Bourne // *Food allergy and intolerance*. London e.a. – 1987. – P. 286–300.

31. Гмошинский, И. В. Определение антител класса IgG у экспериментальных животных, сенсibilизированных перорально пищевым белком (к характеристике модели пищевой анафилаксии). / И. В. Гмошинский, В. В. Кржечковская, Н. Н. Пятницкий // *Вопросы питания*. – 1994. – № 1-2. – С. 30–33.

32. JCGM 100:2008, Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement. – URL: [https://www.bipm.org/documents/20126/2071204/JCGM\\_100\\_2008\\_E.pdf/cb0ef43f-baa5-11cf-3f85-4dcd86f77bd6](https://www.bipm.org/documents/20126/2071204/JCGM_100_2008_E.pdf/cb0ef43f-baa5-11cf-3f85-4dcd86f77bd6) (дата обращения: 12.06.2022).

33. New insights on mast cell activation via the high affinity receptor for IgE / J. Rivera, N. A. Fierro, A. Olivera [et al.] // *Adv Immunol*. 2008. – Vol. 98. – P. 85–120. – DOI: 10.1016/S0065-2776(08)00403-3.

34. Mast cell: an emerging partner in immune interaction / G. Gri, B. Frossi, F. D'Inca [et al.] // *Front Immunol*. – 2012. – No 3. – P. 120. – DOI: 10.3389/fimmu.2012.00120.

35. The Inhibitory Effects of Low-Dose Ionizing Radiation in IgE-Mediated Allergic Responses / H. M. Joo, S. J. Kang, S. Y. Nam [et al.] // *PLoS One*. – 2015. – No 8. – P. e0136394. – DOI: 10.1371/journal.pone.0136394.

36. Влияние органоминеральной композиции на развитие радиоиндуцированной аллергии / Р. П. Гайнуллин, Р. Н. Низамов, Н. М. Василевский [и др.] // *Ветеринарный врач*. – 2021. – № 5. – С. 4–9

## References

1. Diagnosis and management of food allergies: new and emerging options: a systematic review / A. W. O'Keefe, S. De Schryver, J. Mill [et al.] // *J Asthma Allergy*. – 2014. – No 7. – P. 141–164. – DOI: 10.2147/JAA.S49277.
2. Berin, M. C. Food allergy: an enigmatic epidemic / M. C. Berin, H. A. Sampson // *Trends Immunol*. – 2013. – No 8. – P. 390–7. – DOI: 10.1016/j.it.2013.04.003.
3. Italian Expert Consensus on Clinical and Therapeutic Management of Multiple Chemical Sensitivity (MCS) / G. Damiani, M. Alessandrini, D. Caccamo [et al.] // *Int J Environ Res Public Health*. – 2021. – Vol. 18 (21). – P. 11294. – DOI: 10.3390/ijerph182111294.
4. Cholera toxin disrupts barrier function by inhibiting exocyst-mediated trafficking of host proteins to intestinal cell junctions / A. Guichard, B. Cruz-Moreno, B. Aguilar [et al.] // *Cell Host Microbe*. – 2013. – No 3. – P. 294–305. – DOI: 10.1016/j.chom.2013.08.001.

5. Intestinal uptake of macromolecules. VI. Uptake of protein antigen in vivo in normal rats and in rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis* or subjected to mild systemic anaphylaxis / K. J. Bloch, D. B. Bloch, M. Stearns [et al.] // *Gastroenterology*. – 1979. – No 5. – P. 1039–1044.
6. Lambrecht, B. N. The airway epithelium in asthma / B. N. Lambrecht, H. Hammad // *Nat Med*. – 2012. – No 5. – P. 684–692. – DOI: 10.1038/nm.2737.
7. The intraepithelial T cell response to NKG2D-ligands links lymphoid stress surveillance to atopy / J. Strid, O. Sobolev, B. Zafirova [et al.] // *Science*. – 2011. – No 2. – P. 1293–1297. – DOI: 10.1126/science.1211250.
8. Aleksakhin, R. M. Nuclear energy and the biosphere / R. M. Aleksakhin. – M. : Energoizdat, 1982. – 215 p.
9. Review and evaluation of updated research on the health effects associated with low-dose ionising radiation / L. T. Dauer, A. L. Brooks, D. G. Hoel [et al.] // *Radiat Prot Dosimetry*. – 2010. – No 2. – P. 103–136. – DOI: 10.1093/rpd/ncq141.
10. Dose and dose-rate effects of ionizing radiation: a discussion in the light of radiological protection / W. Rühm, G. E. Woloschak, R. E. Shore [et al.] // *Environ Biophys*. – 2015. – No 4. – P. 379–401. – DOI: 10.1007/s00411-015-0613-6.
11. Organ-Specific Effects of Low Dose Radiation Exposure: A Comprehensive Review / E. Shin, S. Lee, H. Kang // *Front Genet*. – 2020. – No 2. – P. 566244. – DOI: 10.3389/fgene.2020.566244.
12. Doss, M. Linear No-Threshold Model VS. Radiation Hormesis / M. Doss // *Dose Response*. – 2013. – No 4. – P. 480–497. – DOI: 10.2203/dose-response.13-005.Doss.
13. Radioecology and ensuring radiation safety / N. I. Sanzharova, S. V. Fesenko, A. V. Panov [et al.] // *History of science and technology*. – 2020. – No 7. – P. 58–72.
14. Stimulating effect of small doses of radiation on the body: monograph / G. V. Konyukhov, R. N. Nizamov N. B. Tarasova [et al.]. – Kazan : FGBNU «FCTRB-VNIVI», 2018. – 409 p.
15. Radioprotective effect of preparations of microbial origin in acute radiation sickness / R. N. Nizamov, N. M. Vasilevsky, R. N. Nizamov [et al.] // *The Veterinarian*. – 2021. – No 2. – P. 34–38.
16. Sato, N. Toxicological approaches to the toxic metabolites of *Fusaria* VIII: acute and subacute toxicities of T-2 toxin in cats / N. Sato, Y. Ueno, M. Enomoto // *Japan. J. Pharmacol*. – 1975. – No 25. – P. 263–270. – DOI: 10.1254/jjp.25.263.
17. Smith, T. K. Recent advances in the understanding of *Fusarium trichothecene* mycotoxicoses / T.K. Smith // *J Anim Sci*. – 1992. – No 12. – P. 3989–3993. – DOI: 10.2527/1992.70123989x.
18. Bergers, W. W. Changes in circulatory white blood cells of mice and rats due to acute trichothecene intoxication / W. W. Bergers, E. A. Dura, J. G. Stap // *Toxicol Lett*. – 1987. – No 2. – P. 173–179. – DOI: 10.1016/0378-4274(87)90182-2.
19. Valiev, A. R. Immunosuppression in the pathogenesis of T-2 mycotoxicosis and its pharmacological correction / A. R. Valiev, E. I. Semyonov, F. G. Akhmetov // *The Veterinarian*. – 2011. – No 2. – P. 4–6.
20. Baskova, E. Yu. The use of enterosorbents based on nanotechnologies to combat animal mycotoxicoses / E. Yu. Baskova // *Scientific notes of the Kazan State Academy of Veterinary Medicine*. N.E. Bauman. – 2008. – T. 192. – P. 234.
21. Mishina, N. N. Preventive efficacy of lignin- and polysaccharide-containing enterosorbents in combined T-2 and aflatoxicosis : specialty 16.00.04 «Veterinary pharmacology with toxicology» : dis. ... cand. of boil. sciences / Mishina Nailya Narimanovna. – Kazan, 2008. – 162 p.
22. Efficiency of application of a polysaccharide enterosorbent of «Fitosorb» for prevention of the combined mycotoxicosis / E. I. Semenov, A. M. Tremasova, V. R. Saitov [et al.] // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. – 2016. – No 2. – P. 2229–2237.
23. Homeostatic system of sheep against the background of combined effects of pollutants and the use of therapeutic and preventive agents / K. K. Papunidi, I. R. Kadikov, V. R. Saitov [et al.] // *Bali Medical Journal*. – 2017. – No 2. – P. 83–87. – DOI: 10.15562/bmj.v6i2.523.
24. Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects / M. C. Smith, S. Madec, E. Coton [et al.] // *Toxins (Basel)*. – 2016. – No 4. – P. 94. – DOI: 10.3390/toxins8040094.
25. Combined lesions of animals and the development of means of prevention and treatment: monograph / K. Kh. Papunidi, G. V. Konyukhov, R. N. Nizamov, [et al.]. – Kazan : FGBNU «FCTRB-VNIVI», 2019. – 248 p.

26. Semenov, E. I. Unaccounted for anaphylactic reaction to the action of mycotoxins / E. I. Semenov, N. N. Mishina, K. Kh. Papunidi // *Medline.ru. Russian biomedical journal.* – 2019. – Т. 20. – P. 36–43.
27. Bondy, G. S. Immunomodulation by fungal toxins / G. S. Bondy, J. J. Pestka // *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* – 2000. – No 2. – P. 109–143. – DOI: 10.1080/109374000281113.
28. Screening drugs-potential immunomodulators for T-2 mycotoxicosis / E. I. Semenov, N. N. Mishina, I. R. Kadikov [et al.] // *Bali Medical Journal.* – 2017. – No 2. – P. 110–114. – DOI: 10.15562/bmj.v6i2.516.
29. Deoxynivalenol: a trigger for intestinal integrity breakdown / P. Akbari, S. Braber, H. Gremmels [et al.] // *FASEB J.* – 2014. – No 6. – P. 2414–2429. – DOI: 10.1096/fj.13-238717.
30. Stokes, C. R. Animal models of food sensitivity / C. R. Stokes, B. G. Miller, F. J. Bourne / *Food allergy and intolerance.* London e.a. – 1987. – P. 286–300.
31. Gmshinsky, I. V. Determination of antibodies of the IgG class in experimental animals sensitized orally with food protein (to characterize the model of food anaphylaxis). / I. V. Gmshinsky, V. V. Krzhechkovskaya, N. N. Pyatnitsky // *Food Issues.* – 1994. – No. 1-2. – P. 30-33.
32. JCGM 100:2008, Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement. – URL: [https://www.bipm.org/documents/20126/2071204/JCGM\\_100\\_2008\\_E.pdf/cb0ef43f-baa5-11cf-3f85-4dcd86f77bd6](https://www.bipm.org/documents/20126/2071204/JCGM_100_2008_E.pdf/cb0ef43f-baa5-11cf-3f85-4dcd86f77bd6) (date of the application: 12.06.2022).
33. New insights on mast cell activation via the high affinity receptor for IgE / J. Rivera, N. A. Fierro, A. Olivera [et al.] // *Adv Immunol.* – 2008. – Vol. 98. – P. 85–120. – DOI: 10.1016/S0065-2776(08)00403-3.
34. Mast cell: an emerging partner in immune interaction / G. Gri, B. Frossi, F. D'Inca [et al.] // *Front Immunol.* – 2012. – No 3. – P. 120. – DOI: 10.3389/fimmu.2012.00120.
35. The Inhibitory Effects of Low-Dose Ionizing Radiation in IgE-Mediated Allergic Responses / H. M. Joo, S. J. Kang, S. Y. Nam [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – No 8. – P. e0136394. – DOI: 10.1371/journal.pone.0136394.
36. The influence of organomineral composition on the development of radioinduced allergy / R. R. Gaynullin, R. N. Nizamov, N. M. Vasilevsky [et al.] // *The Veterinarian.* – 2021. – No 5. – P. 4–9.

Ветеринарный врач. 2023. № 2. С. 70 – 77.  
The Veterinarian. 2023; (2): 70 – 77

Научная статья

УДК 637.07

DOI: 10.33632/1998-698X\_2023\_2\_70

### **Особенности подбора праймеров и зондов гена каппа-казеина (CSN3) для проведения полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ)**

Саида Нурбиевна Марзанова<sup>1</sup>, Нина Валерьевна Коновалова<sup>2</sup>, Яков Игоревич Алексеев<sup>2</sup>, Юрий Михайлович Ходарович<sup>3</sup>, Давуд Абдулсемедович Девришов<sup>1</sup>, Нурбий Сафарбиевич Марзанов<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина, Москва, Россия.

<sup>2</sup>ООО «НПФ Синтол», Москва, Россия.

<sup>3</sup>ФГБУН Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва.

<sup>4</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени Л.К. Эрнста», Подольск-Дубровицы, Московская область, Россия.

Автор, ответственный за переписку: Саида Нурбиевна Марзанова, s.marzanova@mail.ru

**Аннотация.** Впервые на основе биоинформативных решений представлена технология создания тест-системы для диагностики 4-х аллелей (CSN3<sup>A</sup>, CSN3<sup>B</sup>, CSN2<sup>C</sup>, CSN2<sup>E</sup>) в локусе каппа-казеина. Биоинформатика является важным инструментом, который значительно улучшает работу исследователя. В статье дано описание этапов работы с базой данных NCBI и программами Oligo 6.0, Primer3 для поиска последовательностей гена каппа-казеина и подбора праймеров и зондов. Все приводимые этапы работ являются актуальными при разработке ПЦР наборов. Описывается алгоритм действий, способствующий формированию общего представления по созданию набора для определения аллелей и генотипов в локусе каппа-казеина у крупного рогатого скота. Показано как идет подбор температурного режима, праймеров, зондов. Зонды метили флуорофорами FAM – карбоксифлуоресцеин и R6G – карбоксиродамин-6G. В качестве гасителей флуоресценции использовали RTQ1 (гаситель флуоресценции семейства RTQ) и BHQ2 (гаситель флуоресценции семейства BHQ). В целях визуализации эксперимента, была представлена схема расположения праймеров и зондов в последовательности геномной ДНК по гену каппа-казеина (CSN3). В ней отмечены места гибридизации праймеров CSN\_F, CSN\_R и аллельспецифичных CSN3-MaeII-wt, CSN3-MaeII-m, CSN3-HinfI-wt2, CSN3-HinfI-m2, CSN3-HaeIII-wt, CSN3-HaeIII-m2 зондов. В результате полученных данных, было решено остановиться на 40 циклах амплификации. При поиске гомологии с помощью интернет-сервиса Nucleotide BLAST online была показана гомология результатов секвенирования с последовательностью гена CSN3 на уровне 99,28%. Аллель CSN3<sup>B</sup> является генетическим маркером, ассоциированный с сыропригодностью коровьего молока, что имеет важное значение для правильного определения генотипов и аллелей в данном локусе.

**Ключевые слова:** крупный рогатый скот, породы, молоко, локус, каппа-казеин, генотип, аллель, полиморфизм, ДНК-технологии, праймеры, CSN3, ПЦР, NCBI.

### **Features of the selection of primers and probes of the kappa-casein gene (CSN3) for polymerase chain reaction with real-time detection (RT-PCR)**

Saida Nurbiyevna Marzanova<sup>1</sup>, Nina Valerievna Konovalova<sup>2</sup>, Yakov Igorevich Alekseev<sup>2</sup>, Yuriy Mikhailovich Khodarovich<sup>3</sup>, Davud Abdulsemedovich Devrishov<sup>1</sup>, Nurbiy Safarbiyevich Marzanov<sup>4</sup>

<sup>1</sup>The Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Skriabin, Moscow, Russia.

<sup>2</sup>Closed Joint Stock Company «Sintol», Moscow, Russia.

<sup>3</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS (IBCh RAS), Moscow, Russia.

<sup>4</sup>L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Podolsk-Dubrovitsy, Moscow Region, Russia.  
Corresponding author: Saida Nurbieva Marzanova, s.marzanova@mail.ru

**Abstract.** For the first time, based on bioinformatic solutions, a technology for creating a test system for the diagnosis of 4 alleles (CSN3<sup>A</sup>, CSN2<sup>B</sup>, CSN2<sup>C</sup>, CSN2<sup>E</sup>) in the kappa-casein locus is presented. Bioinformatics is an important tool that greatly improves the work of a researcher. The article describes the stages of working with the NCBI database and the Oligo 6.0, Primer3 programs for searching for kappa-casein gene sequences and selecting primers and probes. All the above work steps are relevant in the development of PCR kits. An algorithm of actions is described that contributes to the formation of a general idea for creating a set for determining alleles and genotypes in the kappa-casein locus in cattle. It is shown how the selection of the temperature regime, primers, probes is going on. The probes were labeled with fluorophores FAM—carboxyfluorescein and R6G—carboxyrodamine-6G. As fluorescence quenchers, RTQ1 (fluorescence quencher of the RTQ family) and BHQ2 (fluorescence quencher of the BHQ family) were used. In order to visualize the experiment, a layout of primers and probes in the genomic DNA sequence for the kappa-casein gene (CSN3) was presented. It marked the sites of hybridization of primers CSN\_F, CSN\_R and allele-specific CSN3-MaeII-wt, CSN3-MaeII-m, CSN3-HinfI-wt2, CSN3-HinfI-m2, CSN3-HaeIII-wt, CSN3-HaeIII-m2 probes. As a result of the obtained data, it was decided to stop at 40 amplification cycles. When searching for homology using the Nucleotide BLAST online Internet service, the homology of the sequencing results with the CSN3 gene sequence was shown at the level of 99.28%. The CSN3<sup>B</sup> allele is a genetic marker associated with the cheese suitability of cow's milk, which is important for the correct determination of genotypes and alleles at this locus.

**Keywords:** cattle, breed, milk, locus, kappa-casein, genotype, allele, polymorphism, DNA-technology, primers, CSN3, PCR, NCBI

**Введение.** Современные биологические исследования во многом основываются на методах биотехнологии и молекулярной биологии, поскольку другие методы являются зачастую недостаточными для оценки биологических явлений, происходящих в организме. Одним из таких важных способов для молекулярных исследований является использование метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР лежит в основе многих современных исследований, поскольку она применяется для определения генов ответственных за хозяйственно-биологические признаки у крупного рогатого скота.

В разработке ПЦР наборов важным является подбор праймеров к определенной последовательности ДНК. Для этого необходима практика работы с различными базами данных и биоинформационными программами по подбору праймеров и зондов. Следует отметить, что некоторые готовые последовательности можно найти в ряде изданных научных публикаций. Хотя никто не может дать гарантию достоверности опубликованных в научных работах праймеров и зондов. Знание элементов биоинформационных программ и баз данных значительно упрощает ситуацию [1; 2; 3; 4]. Каппа-казеин, ген ответственный за сложный молочный белок, который используется в хозяйственной деятельности, как фактор сыропригодности молока коров. В частности, CSN3<sup>B</sup> аллель ассоциирован с высоким содержанием белка в молоке и лучшими сыродельческими свойствами [5 - 8].

Целью исследований было охарактеризовать основной принцип подбора праймеров и аллельспецифичных зондов для определения аллелей в локусе каппа-казеина (CSN3).

**Материалы и методы.** Поиск генов, проводили в международной базе данных NCBI (National Center for Biotechnological Information, USA, национальный центр биотехнологической информации в США). Биоинформационная база данных NCBI дает возможность ознакомиться со структурой генома живых организмов, в частности о нуклеотидных и аминокислотных последовательностях. Интернет-ресурс является доступным для любого исследователя и не имеет ограничений. Праймеры и аллельспецифичные зонды подбирали с помощью пакета биоинформационных программ «Oligo 6.0» (<https://www.oligo.net/>), «Primer3» (<https://Primer3.org>). Поиск структур нужных нам генов осуществляли через алгоритм BLAST, используя базу данных NCBI.

Олигонуклеотидные праймеры и зонды были синтезированы в ООО «НПФ Синтол» твердофазным амидофосфитным методом. Постановку ПЦР-РВ и секвенирование проводили с помощью программного обеспечения, поставляемого вместе с оборудованием.

Оптимизацию условий постановки ПЦР проводили на ДНК, полученной из цельной крови крупного рогатого скота. Всего было исследовано 282 коровы, принадлежащих к разным генеалогическим корням. Кровь отбирали в стандартные пробирки с антикоагулянтом, представлявший 0,05% раствор ЭДТА. ДНК из цельной крови выделяли с помощью наборов «S-Сорб»,

Кат№: EX-516, согласно инструкции производителя (ООО «НПФ Синтол», г. Москва, Россия), Определение аллелей и генотипов в локусе каппа-казеина проводили на амплификаторе Rotor Gene Q (Qiagen, Германия) как это было описано ранее [3].

**Результаты исследований.** Для постановки полимеразной цепной реакции необходим грамотный подбор праймеров. Применяли два праймера – прямой (Forward, в работе обозначаемый CSN\_F) и обратный (Reverse - в работе обозначаемый CSN\_R), – комплементарные противоположным концам разных цепей участка ДНК. ДНК-полимераза, используя праймер в качестве затравки, синтезирует дочернюю нить ДНК, присоединяя нуклеотиды к 3'-концу комплементарно-матричной цепи [1,3,9]. В базе данных NCBI находили последовательности ДНК целевого гена (рис. 1).

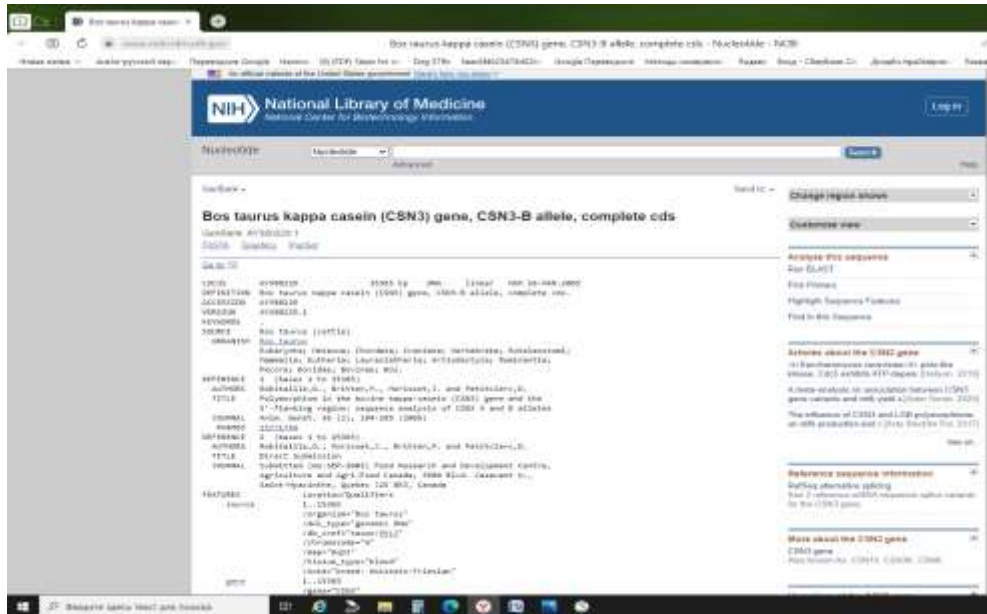


Рисунок 1 – Информация о гене каппа-казеина (CSN3) крупного рогатого скота (*Bos taurus* L.) в базе данных NCBI

Далее в последовательности ДНК на основании данных литературы находили участки, с соответствующими мутациями [10,11]. На рисунке 2 они выделены синей, фиолетовой и зеленой рамками. Следует отметить, что при поиске участка с мутацией в материалах NCBI, фрагмент должен быть длиной не более 10 п.о. Выбирали участок ДНК, захватывающий район мутации и примерно 300 нуклеотидов до и после него. Эту последовательность ДНК и использовали для подбора праймеров. Процесс температурного отжига устанавливали в пределах от 58 °С до 61 °С. Что касается праймеров, то они подбирались длиной от 18 до 27 нуклеотидов. Наличие повторяющихся подряд нуклеотидов (четырёх G, C и трех A, T) нежелательно, а на 3'-конце должен находиться аденин или тимин. Прямой праймер (CSN\_F) должен находиться до первой мутации, а обратный (CSN\_R) – после третьей. В результате амплификации должен получиться ПЦР-продукт, содержащий все три мутации.

Поскольку данная работа проводилась для создания Набора по выявлению гена каппа-казеина (CSN3) методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени, в ПЦР-смеси присутствовали так же и олигонуклеотидные зонды, которые аналогичным образом подбирали с помощью программ «Oligo 6.0» и «Primer3».



```

11281 gatgtgatgt ggaatatata tatttatcat ataagtgat attatgtgat atatatcaca
11341 ttatatcaca atatatcaca fgatgtgatg tggaatatat attattatat agttttatat
11401 aatatatatt aataattgat tagttctatt actttggcca cctgatgtga agagctgact
11461 catttgaaaa gaccctgatg ctaggaaaga ttgagggcag gaggagaagg ggcgcacaga
11521 ggatggogtg gttggatggc atcatggact caatggacat gggctgggtt ggcgcacaga
11581 aattgggtgat ggacaggggt gccatggttg ctgacgttca tggggtcaga aagagttggg
11641 catgactgag cgaactgaact gaactgaact gaatatataa tatataataa ttataatatt
11701 atatatataa tatattataa aattttataa attatataaa aaatatataa acccaagaat
11761 ccatatcaca tcacatcatt acatataata tataatataa tgtataaat aattttataa
11821 attagatgat tatataatat acagtattaa tatattagta tataatataa ttgtatatag
11881 ttaactgcac ctaattaatg tattttatga ctgacacctaa ttgatagoac tgtggcaaat
11941 aaagatggaa aatttcctga actgattttt aacggataaa actaagcaga aaaaaaaccc
12001 caacatataa acccaggaat ccacatcaca ttatttttac tattttgctt gaattagttt
12061 agataaaatg cacccttaac ctaattcccta gataaataaa ataaaaacaa attacaaca
12121 tgtggtgaga ataacatat atatatatat atacacacac acacatataa accactatat
12181 atatggaaag agatatacag tttttttctt tgggtgtagt atgcttgtgt attgtatgtc
12241 aaagctctct atgaaactgg tctagctgtg gtgcttataa agtgcaacat ttactgagca
12301 ctttttataa atggcaagct ctgggcaaa ggtgttacat tatgagctat ctcatcta
12361 tttttttgaa actaatgtta tttttaatat ttgctgaaaa tcaagaagtg gaaggaaat
12421 gtacaaatcc atattttata aaataatgat gtttctgggt tcactattcc caatgttga
12481 ctttcttaac atcaaatat gtaacaattt gtttcaaaaa attctgattt aagatattc
12541 ctactctgc ttctgctgct gctaagtcgc ttcagtcctg gctgactctt gcgaacctt
12601 agatggcagc ccaactagcc cccagttccc tgggattctc caggcaagaa ataataccat
12661 tctgcataat ttattttttt acagcgctgt gagaagatg aaagattctt cagtgcacaa
12721 atagccaaat atatcccaat fcagtatgtg ctgagtaggt atcctagtta tggactcaat
12781 tactccaac agaaccagt tgcactaat fcactcaat ttctgcata cccatattt
12841 gcaagccag ctgacgttag gtcacctgcc caaattcttc aatggccagt ttgtcaaat
12901 actgtgctct ccaagtcctg ccaagccag ccaactacca tggcacgtca cccacccca
12961 ctttcttaac ttatggccat tccaccaaa aaaaatcagg ataaaacaga aatccctacc
13021 atcaatacca ttgctagtgg tggacctaca agtccacctc ccatcgagc agtgaagagc
13081 actgtagctc ctctgaagc ttctccc gaa gttegtgaga gccca ctga gtcacacaca
13141 gtccaagtta cttcaactgc ggtctaaata ctctaaagg acatcaaaga agacaacgca
13201 ggtaaataag caaataaat aacagccaag attcatggac ttattaataa aatcgtaca
13261 tctaactag cgtagatgga taatataat ctgttacaga gaaggcgaa tgggctaatt
13321 ataacttaca tttgctggtt ctttatcatg tatatactag attctttccc aacaagaag
13381 ttttaaaata ttttcaaaaa tgagtaaaaa ttgcagattt tattattaaa cttttttcaa
13441 caattgggtat actccttgaa tctattagtt ttattttact cctgttcaca cacaaaaaca
13501 gtaaaataca gtgtcaactc atgatttttc ttatctcaa aatatgtttt cttgaaaaa
13561 aatcatatag gatatgagtt taatatatt ttaattgtat accagtgtt ttgactcta
13621 cttttggtaa gaatagaatg aaaggaaaca atgtttcact catagcattt tatctcagc
13681 atcacctctg aaaggatgta taaggtagg cacccaaatt tctcctattg taaggtaatc
13741 ccacagaaaa attctaattt ttaacttgaa aagcacctac ttattaagag gaaactttca
13801 gaactttaaa tataatgtaa aatatgtcta tttattattt gaatcaatg ataattggcag
13861 agtccaaaaa aattttaaacc acatgaagag gttaaacaga aagatcaata agatagaaaa
13921 taactaaaga ttgtgaata atttaggaag atttggaca cattttgaga tgcagacaa
13981 caaatacttt catcacactg tctacatgat ttttggctc aatgaactc agcatgatat
14041 aatggtaata gcaatagatc agagaagcct ggttctctg ttgtgtgact ttaagcaat
14101 cattactctc tctaaagagt catcacctctc attttctcat aattttggtt gctatgagat
14161 tcaagtgaga aagcatattg tgaatgaggt gtaaaaagca atcaatctgt gaaatataat
14221 gctctagaaa agaagtataa ttgataata ttaaaattta ctttcaacta aatatcaag
14281 tccttactaa attatcaaaa ctacataaca atctcagttt aatcctgtag cagccatag
14341 gaatggatta tattaccatc ttaaatccac aactgaaagc tatggatgca aattgctaca
14401 gctgaaagtt caaaactgga aaccaaatca aactgcttg atttcagata gtaaggctta
14461 attagtacgt ctgctatctc catatgggct atttgttaa aaaaataaaa ataaaaacag
14521 aaaaactact ctaattttcc aagatcagca tatgtgtaaa ttttattact gagattgtgt

```

Примечание: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY380229.1?report=genbank&log\\$=nuclalign&blast\\_rank=1&RID=9BVZ7YWE016](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY380229.1?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=1&RID=9BVZ7YWE016)

Рисунок 2 – Последовательность ДНК гена каппа-казеина, которую использовали для подбора праймеров

На рисунке 3, в целях визуализации эксперимента, была показана схема расположения праймеров и зондов в последовательности геномной ДНК по гену каппа-казеина (CSN3). В ней представлены места гибридизации праймеров CSN\_F, CSN\_R и аллельспецифичных CSN3-MaeII-wt, CSN3-MaeII-m, CSN3-HinfI-wt2, CSN3-HinfI-m2, CSN3-HaeIII-wt, CSN3-HaeIII-m2, зондов.

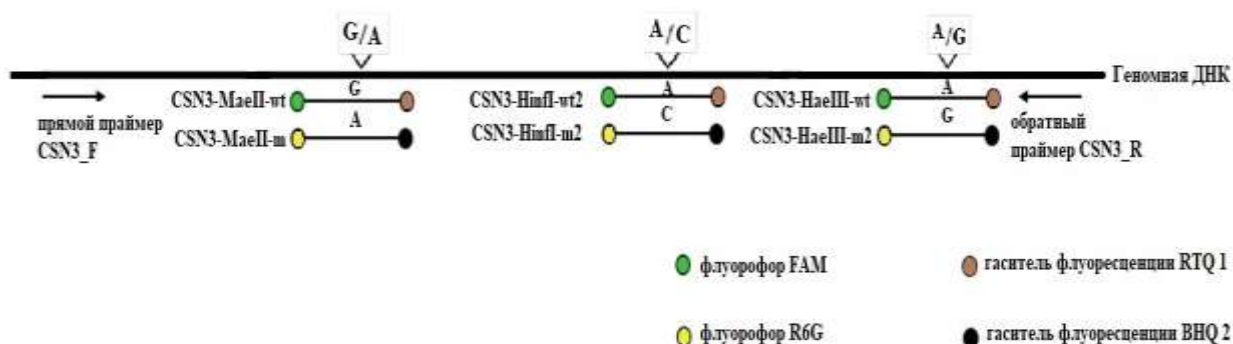


Рисунок 3 – Расположение праймеров и зондов в последовательности геномной ДНК по гену каппа-казеина (CSN3)

В данной работе мы применили технологию дифференциации аллелей с помощью олигонуклеотидных зондов, соответственно в зависимости от того есть мутация или нет, будет лучше или хуже отжигаться тот или иной зонд.

После проведения всех исследований, были подобраны пары праймеров и трех пар аллельспецифичных зондов для гена каппа-казеина (CSN3). Зонды метили флуорофорами FAM – карбоксифлуоресцеин и R6G – карбоксиродамин-6G. В качестве гасителей флуоресценции использовали RTQ1 (гаситель флуоресценции семейства RTQ) и BHQ2 (гаситель флуоресценции семейства BHQ). Праймеры и зонды были синтезированы в ООО «НПФ Синтол» (Москва, Россия) [7, 12].

Анализ выбранных праймеров и определение температуры отжига проводили по программам «Oligo 6.0», «Primer3». Подбор оптимальных условий проведения ПЦР для определения аллелей и генотипов в локусе каппа-казеина (CSN3) у крупного рогатого скота, показал, что наилучшая эффективность амплификации и разгорания зондов наблюдалась при температуре отжига 61 °С. Кроме этого, в результате электрофореза было обнаружено, что побочных продуктов мало при 61 °С, поэтому использовали ее. В тоже время понижение температуры до 58 °С, приводило к появлению неспецифических продуктов ПЦР.

В результате, нами был проведен анализ подбора праймеров и зондов, условий их работы для постановки ПЦР-РВ. Далее подобранные праймеры и зонды проверялись исследованиями соответствующей выборки животных. Исследования проводили на амплификаторе Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия). Количество циклов составляло от 35 до 45. Увеличение числа циклов влияло на время проведения теста и не повышало чувствительность реакции. В результате полученных данных, решено было остановиться на 40 циклах амплификации. Исходили из возможности приборов, для лучшей репрезентативности данных, до 10 циклов может быть не детектируемыми. Соответственно первые 10 циклов без детекции и 30 циклов с детекцией флуоресцентного сигнала. Параметры эксперимента для определения 4-х аллелей локуса каппа-казеина выглядели следующим образом: удерживание температуры: 15 мин. – при 94 °С (один цикл); циклирование 1: 20 сек. – при 94 °С; 20 сек. – при 61 °С, 30 сек. – при 64 °С (10 циклов); циклирование 2: 20 сек. – при 94 °С, 20 сек. – при 61 °С, 30 сек. – при 64 °С (30 циклов), детекция по каналам Green, Yellow.

ПЦР с электрофоретическим методом детекции исследуемой ДНК осуществляли с использованием амплификатора «Терцик» (ООО «ДНК-технология», Москва, Россия) по следующей программе: 3 мин. – при 94 °С (один цикл); 20 сек. – при 94 °С, 20 сек. – при 61 °С, 30 сек. – при 64 °С (40 циклов).

Детекцию продуктов ПЦР осуществляли с использованием оборудования: источник постоянного тока с напряжением 150-460 В («Эльф-4», «ДНК-технология», Москва, Россия), ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей («Биоком», Москва, Россия), видеосистема с цифровой видеокамерой для регистрации результатов («Биотест-1», «ЦНИИ Эпидемиология», Москва, Россия), камера для горизонтального электрофореза объемом не более 400 мл («SE-2», «Хеликон», Москва, Россия) методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле, содержащем бромистый этидий. В результате, мы получили специфичный продукт размером 453 п.н. (цифры 1, 2, 3, 4, 5) (Рис. 4).

На рисунке 4 видно, что в реакции побочных продуктов практически нет. Наличие небольшого количества побочных продуктов при ПЦР с электрофоретическим методом детекции не является критичным, так как специфичность ПЦР-РВ намного выше за счёт использования не только специфичных праймеров, но и зондов типа TaqMan.

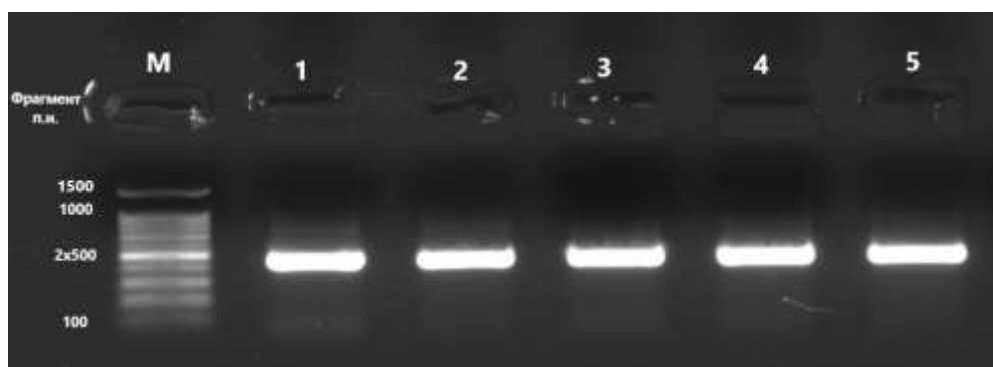


Рисунок 4 – Электрофореграмма результатов ПЦР качества праймеров при определении генотипов каппа-казеина (CSN3) с ДНК пяти животных. «М» – маркер длин фрагментов с шагом 100 п.н.

Полимеразная цепная реакция с электрофоретическим методом детекции позволяет только предположить об амплификации участка ДНК определяемого гена. Подтверждение же, возможно было получить после секвенирования продукта, извлеченного из геля. Окончательный вывод о правильности наших действий проводили после сравнения сиквенса с последовательностью гена в базе данных NCBI.

При поиске гомологии с помощью интернет-сервиса Nucleotide BLAST online была показана гомология на уровне 99,28% результатов секвенирования с последовательностью гена CSN3, что видно из таблицы 1.

Таблица 1 – Результат поиска в базе данных NCBI последовательностей, гомологичных ПЦР-продукту, полученному при использовании тест-системы на локус каппа-казеина (CSN3)

Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100									
select all 30 sequences selected									
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
<a href="#">Bos taurus partial csn3 gene for kappa casein, exon 4</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	250	250	93%	1e-64	99.28%	874	<a href="#">AJ849456.1</a>	
<a href="#">Bos taurus partial k-casein gene for kappa-casein, exon 4, allele BB</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	250	250	93%	1e-64	99.28%	874	<a href="#">AJ841941.1</a>	
<a href="#">Bos taurus kappa-casein (CSN3) gene, CSN3-AB allele, partial cds</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	244	244	93%	7e-63	98.56%	510	<a href="#">KP697162.1</a>	
<a href="#">Bos taurus partial k-casein gene for kappa-casein, exon 4, allele AB</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	244	244	93%	7e-63	98.56%	874	<a href="#">AJ841944.1</a>	
<a href="#">Bos taurus kappa casein gene, exon 4 and partial cds</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	243	243	94%	2e-62	97.87%	741	<a href="#">EF378700.1</a>	
<a href="#">Bos taurus kappa-casein (CSN3) gene, exon 4 and partial cds</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	239	239	93%	3e-61	97.84%	565	<a href="#">MK455075.1</a>	
<a href="#">PREDICTED: Bos taurus casein kappa (CSN3), transcript variant X1, mRNA</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	239	239	93%	3e-61	97.84%	888	<a href="#">XM_024992988.1</a>	
<a href="#">Bos taurus kappa-casein (CSN3) gene, CSN3-AA allele, partial cds</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	239	239	93%	3e-61	97.84%	518	<a href="#">KP697163.1</a>	
<a href="#">Bos taurus casein kappa (CSN3), mRNA</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	239	239	93%	3e-61	97.84%	846	<a href="#">NM_174294.2</a>	
<a href="#">Bos taurus breed Sheko kappa casein (CSN3) gene, CSN3-B allele, exon 4 and partial cds</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	239	239	93%	3e-61	97.84%	557	<a href="#">HQ589920.1</a>	
<a href="#">Bos taurus kappa-casein (CSN3K) gene, exon IV and partial cds</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	239	239	93%	3e-61	97.84%	373	<a href="#">EF133462.1</a>	
<a href="#">Bos taurus casein kappa, mRNA (cDNA clone MGC:126997 IMAGE:7941150), complete cds</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	239	239	93%	3e-61	97.84%	852	<a href="#">BC102120.1</a>	
<a href="#">Bos taurus partial k-casein gene for kappa-casein, exon 4, allele AB</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	239	239	93%	3e-61	97.84%	874	<a href="#">AJ841942.1</a>	
<a href="#">Bos taurus kappa casein (CSN3) gene, CSN3-B allele, complete cds</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	239	239	93%	3e-61	97.84%	15365	<a href="#">AY380229.1</a>	
<a href="#">Bos taurus kappa casein (CSN3) gene, CSN3-A allele, complete cds</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	239	239	93%	3e-61	97.84%	15346	<a href="#">AY380228.1</a>	
<a href="#">Bos taurus kappa-casein precursor (CSN3) gene, CSN3-F allele, exon 4 and partial cds</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	239	239	93%	3e-61	97.84%	551	<a href="#">AF123250.1</a>	
<a href="#">Bos taurus kappa-casein (CSN3) gene, variant B, partial cds</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	239	239	93%	3e-61	97.84%	299	<a href="#">U84251.1</a>	
<a href="#">Bos taurus kappa-casein (CSN3) gene, variant A, partial cds</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	239	239	93%	3e-61	97.84%	299	<a href="#">U84250.1</a>	
<a href="#">Bovine gene for kappa-casein exons 3-5</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	239	239	93%	3e-61	97.84%	7595	<a href="#">X14908.1</a>	
<a href="#">Bos taurus mRNA for pre-kappa-casein A</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	239	239	93%	3e-61	97.84%	850	<a href="#">X00565.1</a>	
<a href="#">Bos taurus breed Holstein-Barka cross breed kappa casein (CSN3) gene, CSN3-E allele, exo...</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	233	233	93%	1e-59	97.12%	561	<a href="#">HQ589917.1</a>	

В таблице 1 показан сиквенс с праймера CSN3\_f, он имеет следующую последовательность: ACACCTACCACCGAAGCAGTAGAGAGCACTGTAGCTACTCTAGAAGCTTCTCCAGAAGT TATTGAGAGCCCACCTGAGATCAACACAGTCCAAGTTACTTCAACTGCGGTCTAAAACTCTAA GGAGACATCAAGAGAAAAACACGCGC. Полученная последовательность соответствует данным сервиса Nucleotide BLAST online. Из полученных данных таблицы 1 видно, что размер ПЦР продукта совпадает с последовательностью каппа-казеина.

**Закключение.** Предложен алгоритм действий поиска нуклеотидной последовательности гена каппа-казеина (CSN3) и принцип подбора праймеров и зондов. Аллель CSN3<sup>B</sup> является генетическим маркером, ассоциированный с сыропригодностью коровьего молока, что имеет важное значение для правильного определения генотипов и аллелей в данном локусе. Последовательность действий по подбору праймеров основывалась на полученных экспериментальных данных. В связи с чем, данное направление по изучению хозяйственно-биологических признаков динамично развивается, что расширяет имеющиеся знания и улучшает качество проводимой научно-исследовательской работы. Тем не менее требуется тщательный анализ последних публикаций литературы, изучения вновь появляющихся Интернет-ресурсов и компьютерных программ по данному вопросу.

### Литература

1. Лысенко, Е.А. Современные методы молекулярной биологии: Полимеразная цепная реакция. Стратегия подбора праймеров для анализа экспрессии генов / Е.А. Лысенко. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – С. 75–96.
2. Лапенков, М.И. Разработка тест-системы для количественной и качественной оценки содержания ДНК в криминалистических образцах методом полимеразной цепной реакции в реальном времени /

- М.И. Лапенков, Н.В. Плахина, Я.И. Алексеев, Д.А. Варламов // Судебно-медицинская экспертиза. – 2011. – Т. 54. – № 2. – С. 34-38.
3. Ковтун, И.С. Особенности подбора праймеров конститутивного гена для проведения полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции / И.С. Ковтун, М.В. Ефимова // Вестник Томского государственного университета // Биология. – 2013. – № 2(22). – С. 160-171.
4. Гарафутдинов, Р.Р. Разнообразие праймеров для ПЦР и принципы их подбора / Р.Р. Гарафутдинов, А.Х. Баймиев, Г.В. Малеев [и др.] // Биомика. – 2019. – Т. 11. – № 1. – С. 23-70.
5. Валитов, Ф.Р. Эффективность использования современных методов маркерной селекции в молочном скотоводстве/ Ф.Р. Валитов. Дисс. докт. с.-х. наук. – Уфа, 2018. – 396с.
6. Кручинин, А.Г. Оценка влияния полиморфизма гена κ-казеина в сухом молоке на технологические свойства кислотно-индуцированных молочных гелей / А.Г. Кручинин, С.Н. Туровская, Е.Е. Илларионова, А.В. Бигаева // Техника и технология пищевых производств. – 2021. – Т.51. – №1. – С.53–66.
7. Марзанова, С.Н. Разработка метода ДНК-диагностики генотипов и аллелей в локусе каппа-казеина [CSN3] и их географический анализ у коров молочных пород / С.Н. Марзанова, Д.А. Девришов, Н.С. Марзанов // Ветеринарный врач. – 2021. – № 4. – С. 36-43.  
DOI 10.33632/1998-698X.2021-4-36-43.
8. Кузнецов, С.Б. Новые сочетания аллелей в вариантах генов казеинового кластера крупного рогатого скота и ревизия их номенклатуры. / С.Б. Кузнецов, Е.В. Солоднева, М.Т. Семина [и др.] // Генетика. – 2022. – Т. 58. – № 8. – С. 889-901. DOI 10.31857/S0016675822080057.
9. Kleppe, K. Studies on polynucleotides. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases/ K. Kleppe // Molecular Biology. – 1971. – Vol. 56. – P. 341–361.
10. Barroso, A. Technical note: Detection of bovine kappa-casein variants A, B, C, and E by means of polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP)/ A. Barroso, S. Dunner, J. Cañón // J. Anim. Sci. – 1998. – Vol.76. – P.1535-1538.
11. McClure, M. Understanding Genetics and Complete Genetic Disease and Trait Definition./ M. McClure, J. McClure. ICBF, Highfield House, Shinagh, Bandon, Co. Cork. Ireland, 2016. – 88p.
12. Матвиенко, И.В. Синтез производных флуоресцентного родаминового красителя на основе дигидрохинолина для анализа нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции в реальном времени / И.В. Матвиенко, В.М. Байрамов, Н.А. Парыгина [и др.] // Биоорганическая химия. – 2020. – Т. 46. – № 3. – С. 310-321. DOI 10.31857/S0132342320030203.

## References

1. Barroso, A. Technical note: Detection of bovine kappa-casein variants A, B, C, and E by means of polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP)/ A. Barroso, S. Dunner, J. Cañón // J. Anim. Sci. – 1998. – Vol.76. – P.1535-1538.
2. Garafutdinov, R.R. Variety of primers for PCR and rationale for their selection / R.R. Garafutdinov, A.Kh. Baimiev, G.V. Maleev [et al.] // Biomika. – 2019. – Т. 11. – No. 1. – S. 23-70.
3. Kleppe, K. Studies on polynucleotides. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases/ K. Kleppe // Molecular Biology. – 1971. – Vol. 56. – P. 341-361.
4. Kovtun, I.S. Features of the selection of primers of the constitutive gene for polymerase chain reaction after reverse transcription / I.S. Kovtun, M.V. Efimova // Bulletin of the Tomsk State University // Biology. – 2013. – No. 2 (22). – S. 160-171.
4. Kruchinin, A.G. Assessment of the influence of κ-casein gene polymorphism in milk powder on the technological properties of acid-induced milk gels / A.G. Kruchinin S.N. Turovskaya, E.E. Illarionova, A.V. Bigaeva // Technics and technology of food production. – 2021. – Т.51. – No.1. – P.53-66.
5. Kuznetsov, S.B. New combinations of alleles in variants of the cattle casein cluster genes and revision of their nomenclature. / S.B. Kuznetsov, E.V. Solodneva, M.T. Semina [et al.] // Genetics. – 2022. – Т. 58. – No. 8. – P. 889-901. DOI 10.31857/S0016675822080057.
6. Lapenkov, M.I. Development of a test system for quantitative and qualitative assessment of DNA content in forensic samples by real-time polymerase chain reaction / M.I. Lapenkov, N.V. Plakhina, Ya.I. Alekseev, D.A. Varlamov // Forensic Medical Examination. – 2011. – Т. 54. – No. 2. – S. 34-38.
7. Lysenko, E.A. Modern methods of molecular biology: Polymerase chain reaction. Primer selection strategy for gene expression analysis / E.A. Lysenko. – М.: BINOM. Knowledge Laboratory, 2011. – P. 75-96.

8. Marzanova, S.N. Development of a method of dna diagnostics of genotypes and alleles at the kappa-casein locus [csn3] and their genogeographic analysis in dairy cows/ S.N. Marzanova, D.A. Devrishov, N.S. Marzanov // The Veterinarian. – 2021. – No. 4. – P. 36-43.  
DOI 10.33632/1998-698X.2021-4-36-43.
9. Matvienko, I.V. Synthesis of derivatives of fluorescent rhodamine dye based on dihydroquinoline for analysis of nucleic acids by real-time polymerase chain reaction / I.V. Matvienko, V.M. Bayramov, N.A. Parygina [et al.] // Bioorganic chemistry. – 2020. – Т. 46. – No. 3. – S. 310-321.  
DOI 10.31857/S0132342320030203.
10. McClure, M. Understanding Genetics and Complete Genetic Disease and Trait Definition./ M. McClure, J. McClure. ICBF, Highfield House, Shinagh, Bandon, Co. Cork. Ireland, 2016. – 88p.
11. Valitov, F.R. The effectiveness of using modern methods of marker selection in dairy cattle breeding. / F.R. Valitov. Diss. doct. s.-kh. sciences. – Ufa, 2018. – 396p.

## ТРЕБОВАНИЯ К СТАТЬЯМ, ПУБЛИКУЕМЫМ В ЖУРНАЛЕ «ВЕТЕРИНАРНЫЙ ВРАЧ»

Статьи, направляемые в редакцию журнала «Ветеринарный врач» для публикации, оформляются в соответствии с ГОСТ Р 7.0.7-2021. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Статьи в журналах и сборниках. Издательское оформление. Статьи для публикации в журнале принимаются как на русском, так и английском языках.

Статью направляют в редакцию журнала в электронном виде в формате Word, шрифт Times New Roman, 11 кегль, одинарный интервал. Электронная почта редакции: [vetvrach@vnivi.ru](mailto:vetvrach@vnivi.ru). Объем статьи должен быть не менее 5 страниц. К статье в сканированном виде прилагаются: сопроводительное письмо организации (пишется в свободной форме на имя главного редактора); справка (образец на сайте [www.vetvrach-vnivi.ru](http://www.vetvrach-vnivi.ru)).

Вышеперечисленные документы высылаются почтой по адресу: 420075, г. Казань, Научный городок-2, ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (для редакции).

**Индекс УДК** помещают в начале статьи на отдельной строке слева (УДК, соответствующий тематике Вашей статьи, можно выбрать на сайте <https://www.teacode.com/online/udc/>).

**Заглавие статьи** – первое слово заглавия статьи приводят с прописной буквы, остальные слова со строчной (кроме собственных имён, общепринятых аббревиатур и т.п.). В конце заглавия статьи точку не ставят. Заглавие располагается по центру.

**Сведения об авторе** (авторах) выравниваются по левому краю статьи и содержат: имя, отчество, фамилию автора (полностью); наименование организации (учреждения), её подразделения, где работает или учится автор (без обозначения организационно-правовой формы юридического лица: ФГБНУ, ФГБОУ ВО, ПАО, АО и т.п.); адрес организации (учреждения), её подразделения, где работает или учится автор (город и страна); электронный адрес автора (e-mail). Электронный адрес автора приводят без слова «e-mail», после электронного адреса точку не ставят.

**Аннотацию** формируют по ГОСТ Р 7.0.99. Объём аннотации не превышает 250 слов. Перед аннотацией приводят слово «Аннотация» («Abstract»).

**Ключевые слова** (словосочетания) должны соответствовать теме статьи и отражать её предметную, терминологическую область. Количество ключевых слов (словосочетаний) не должно быть меньше 3 и больше 15 слов (словосочетаний). Их приводят, предваряя словами «Ключевые слова:» («Keywords:»), и отделяют друг от друга запятыми. После ключевых слов точку не ставят.

**Основной текст статьи** может быть структурирован и состоять из следующих частей: введение с описанием актуальности, цели и задачи; собственно, текст статьи (с выделением разделов «Материалы и методы», «Результаты исследований»); заключение, с описанием результатов работы, их практической и научной полезности.

Каждый раздел начинается с красной строки. Ссылки на литературу приводятся в тексте в квадратных скобках арабскими цифрами ([2, 4]). Единицы измерений и размерности даются по ГОСТ 8.417-2002. Государственная система обеспечения единства измерений (ГСИ). Единицы величин  
**Список источников.** Оформляется в алфавитном порядке, в начале списка отечественные авторы, далее зарубежные авторы

**Английская часть статьи.** В нее входит: название статьи, авторы, название учреждения, резюме, ключевые слова, литература.

Обращаем внимание авторов, о недопустимости использования машинного перевода. Вместо десятичной запятой используется точка. Все русские аббревиатуры передаются в расшифрованном виде, если у них нет устойчивых аналогов в англ. яз.

Плата с аспирантов за публикацию рукописей не взимается.

Статьи, оформленные не по требованиям журнала, к рассмотрению не принимаются

## REQUIREMENTS FOR ARTICLES PUBLISHED IN "THE VETERINARIAN" JOURNAL

Articles sent to the editors of the journal "Veterinary Doctor" for publication are issued in accordance with GOST R 7.0.7-2021 "System of Standards for Information, Library and Publishing. Articles in journals and collections. Articles for publication in the journal are accepted in both Russian and English.

The article is sent to the editorial office of the magazine in electronic form in Word format, Times New Roman font, 11 kegl, single interval. Sent to e-mail editors: [vetvrach@vnivi.ru](mailto:vetvrach@vnivi.ru); The length of the article should be at least 5 pages. Attached to the article in scanned form are: cover letter of the organization (written in free form in the name of the editor-in-chief); Help (sample on site [www.vetvrach-vnivi.ru](http://www.vetvrach-vnivi.ru)).

The above documents are sent by mail at 420075, Kazan, Scientific Town-2. FSBNU "FCTRB-VNIVI" (for the editorial office).

**The UDC index** is placed at the beginning of the article on a separate line on the left (the UDC corresponding to the subject of your article can be selected on the <https://www.teacode.com/online/udc/website>).

**The title of the article** - the first word of the title of the article is given with a capital letter, the remaining words - with a lowercase (except for their own names, generally accepted abbreviations, etc.). At the end of the title of the article they do not put an end. The title is located in the center.

**Information about the author** (s) is aligned on the left edge of the article and contains: first name, patronymic, last name of the author (completely); the name of the organization (institution), its subdivision, where the author works or learns (without designating the organizational and legal form of a legal entity: FSBNU, FSBOU VO, PJSC, JSC, etc.); address of the organization (institution), its subdivision, where the author works or studies (city and country); e-mail address of the author. The author's email address is given without the word "e-mail," after the email address the point is not put.

**The annotation** is formed according to GOST R 7.0.99. The annotation volume does not exceed 250 words. Before annotation, the word "Abstract" is given.

**Keywords** (phrases) must correspond to the topic of the article and reflect its substantive, terminological field. The number of keywords (collocations) must not be less than 3 and more than 15 words (collocations). They are cited, preceded by the words "Keywords:" and separated from each other by commas. After keywords do not put a point.

**The main text of the article** can be structured and consist of the following parts: an introduction describing the relevance, purpose and tasks; the actual text of the article (highlighting the sections "Materials and methods," "Research results"); conclusion, describing the results of the work, their practical and scientific usefulness;

Each section begins with a red line. References to literature are given in square brackets in Arabic numerals ([2, 4]). Units of measurement and dimensions are given according to GOST "Units of physical quantity" (in accordance with the SI International System)

**List of sources.** Issued in alphabetical order, at the beginning of the list domestic authors, then foreign authors

**English part of the article.** It includes: the title of the article, authors, the name of the institution, resume, keywords, literature.

We draw the attention of the authors to the inadmissibility of using machine translation. A period is used instead of a decimal point. All Russian abbreviations are transmitted in decrypted form if they do not have stable analogues in English.

Graduate students are not charged to publish manuscripts.

Articles issued not according to the requirements of the journal are not accepted for consideration.

## УЧРЕДИТЕЛЬ И ИЗДАТЕЛЬ

**ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)**

И.о. главного редактора **Василевский Николай Михайлович** - доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»

*РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ*

**Василевич Ф.И.** - доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, г. Москва

**Алиев А.Ю.** - доктор ветеринарных наук, г. Махачкала.

**Равилов Р.Х.** - доктор ветеринарных наук, профессор, г. Казань.

**Андреева А.В.** - доктор биологических наук, профессор, г. Уфа

**Балакзиев Н.А.** - доктор с.-х. наук, профессор, академик РАН, г. Москва

**Гламаздин И.Г.** - доктор ветеринарных наук, профессор, г. Москва.

**Шабунин С.В.** - доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, г. Москва.

**Гулюкин А.М.** - доктор ветеринарных наук, чл.-корр. РАН, г. Москва.

**Девришов Д.А.** - доктор биологических наук, профессор, чл.-корр. РАН, г. Москва.

**Дорожкин В.И.** - доктор биологических наук, профессор, академик РАН, г. Москва.

**Канарский А.В.** - доктор технических наук, г. Казань.

**Колумиец С.Н.** - доктор биологических наук, доцент, г. Москва.

**Кочин И.И.** - доктор с.-х. наук, профессор, академик РАН, г. Москва.

**Мирзоев Э.Б.** - доктор биологических наук, г. Обнинск.

**Низкитин А.Н.** - кандидат с.-х. наук, республика Беларусь, г. Гомель

**Панов А.В.** - доктор биологических наук, профессор РАН, г. Обнинск.

**Семенов В.Г.** - доктор биологических наук, профессор, г. Чебоксары.

**Сухинин А.А.** - доктор биологических наук, профессор, г. Санкт-Петербург.

*РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ*

**Кадиков И.Р.** - доктор биологических наук, г. Казань.

**Сайтов В.Р.** - доктор биологических наук, г. Казань

**Спиридонов Г.Н.** - доктор биологических наук, г. Казань

**Тремасова А.М.** - доктор биологических наук, г. Казань

**Яруллин А.И.** - кандидат биологических наук, г. Казань.

**Вагин К.Н.** - доктор биологических наук, г. Казань.

**Рахматуллин Э.К.** - доктор ветеринарных наук, г. Казань.

**Семёнов Э.И.** - доктор ветеринарных наук, г. Казань

**Смоленцев С.Ю.** - доктор биологических наук, г. Йошкар-Ола

**Фролов А.В.** - доктор биологических наук г. Казань

Технический редактор – О.В. Шлямина

**Подписной индекс: в Российской Федерации «Объединенный каталог. Пресса России. Газеты и журналы» - 43596**

Зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)  
Свидетельство ПИ № ФС 77-77647 от 31.01.2020 г.

Адрес редакции, издателя  
420075, г. Казань, Научный городок-2  
ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»  
Тел./факс: (843) 239-71-73  
E-mail: vetvrach@vniivi.ru

*EDITORIAL COUNCIL*

**Vasilevich F.I.** - Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Academician of the RAS Moscow

**Aliiev A.Yu.** - Doctor of Veterinary Sciences, Makhachkala,

**Ravilov R.Kh.** - Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Kazan.

**Andreeva A.V.** - Doctor of Biological Sciences, Professor, Ufa.

**Balakirev N.A.** - Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Academician of the RAS Moscow.

**Glamazdin I.G.** - Doctor of Veterinary Sciences, Professor Moscow.

**Shabunin S.V.** - Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Academician of the RAS, Moscow.

**Gulyukin A.M.** - Doctor of Veterinary Sciences, Corresponding Member of the RAS, Moscow.

**Devriшов D.A.** - Doctor of Biological Sciences, Professor, Corresponding Member of the RAS, Moscow

**Dorozhkin V.I.** - Doctor of Biological Sciences, Professor, Academician of the RAS, Moscow.

**Kanarsky A.V.** - Doctor of Technical Sciences, Kazan.

**Kolomiets S.N.** - Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Moscow.

**Kochish I.I.** - Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Academician of the RAS, Moscow.

**Mirzoev E.B.** - Doctor of Biological Sciences, Obninsk.

**Nikitin A.N.** - Candidate of Agricultural Sciences, Gomel, Belarus

**Panov A.V.** - Doctor of Biological Sciences, Professor the RAS, Obninsk.

**Semenov V.G.** - Doctor of Biological Sciences, Professor, Cheboksary.

**Sukhinin A.A.** - Doctor of Biological Sciences, Professor, St. Petersburg.

*EDITORIAL BOARD*

**Kadikov I.R.** - Doctor of Biological Sciences, Kazan.

**Saitov V.R.** - Doctor of Biological Sciences, Kazan.

**Spiridonov G.N.** - Doctor of Biological Sciences, Kazan.

**Tremasova A.M.** - Doctor of Biological Sciences, Kazan.

**Yarullin A.I.** - Candidate of Biological Sciences, Kazan.

**Vagin K.N.** - Doctor of Biological Sciences, Kazan.

**Rakhmatullin E.K.** - Doctor of Veterinary Sciences, Kazan.

**Semenov E.I.** - Doctor of Veterinary Sciences, Kazan.

**Smolentsev S.Yu.** - Doctor of Biological Sciences, Yoshkar Ola.

**Frolov A.V.** - Doctor of Biological Sciences, Kazan.

Executive Secretary – O.V. Shlyamina

**Subscription index: the Russian Federation "United catalogue. Russian Press. Newspapers and magazines " - 43596**

Editorial, Publisher Address  
420075 Kazan, Nauchnyi Gorodok -2  
FSBSI "FCTRB-RRVI"  
Tel./Fax: (843) 239-71-73  
E-mail: vetvrach@vniivi.ru

Выход в свет – 14.04.2023 г. Тираж 1350 экз. Свободная цена  
Журнал входит в перечень рецензируемых научных изданий ВАК  
Отпечатано в типографии «Альянс» г. Казань, Сибирский тракт 34.